

**UNTERSUCHUNGEN ZUM AUF- UND ABBAU
VON STOFFEN MIT ANTIBIOTISCHER WIRKUNG
DURCH IN FUTTERMITTELN VORKOMMENDE
PENICILLIEN UND ASPERGILLEN**

Johann Bauer

1976



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie,
Infektions- und Seuchenmedizin
des Fachbereichs Tiermedizin der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Dr. h. c. A. Mayr

Arbeit angefertigt unter Leitung von Frau Prof. Dr. B. Gedek

UNTERSUCHUNGEN ZUM AUF- UND ABBAU
VON STOFFEN MIT ANTIBIOTISCHER WIRKUNG
DURCH IN FUTTERMITTELN VORKOMMENDE
PENICILLIEN UND ASPERGILLEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
des Fachbereichs Tiermedizin der Ludwig-Maximilians-Universität
München



von
Johann Bauer
aus
Dingolfing
München 1976

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs
Tiermedizin der Universität
München

Dekan: Prof. Dr. B. Vollmerhaus
Referent: Prof. Dr. B. Gedek
Korreferent: Prof. Dr. H. Zucker

Tag der Promotion: 30. Juli 1976



DISSERTATIONS- UND FOTODRUCK FRANK oHG
8 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2 8 0 9 0 9 0

1. Deutsch	1
2. Mathematik	2
3. Naturwissenschaften	3
4. Kunst	4
5. Musik	5
6. Sport	6
7. Sozialkunde	7
8. Religion	8
9. Fremdsprachen	9
10. Sonstige	10
11. Zusammenfassung	11
12. Literatur	12
13. Geschichte	13
14. Geographie	14
15. Biologie	15
16. Chemie	16
17. Physik	17
18. Astronomie	18
19. Erdkunde	19
20. Wetter und Klima	20
21. Umwelt	21
22. Verkehrsmittel	22
23. Arbeit	23
24. Freizeit	24
25. Gesundheit	25
26. Ernährung	26
27. Kleidung	27
28. Wohnen	28
29. Geld	29
30. Recht	30
31. Politik	31
32. Medien	32
33. Internet	33
34. Handy	34
35. Computer	35
36. Spiele	36
37. Sportarten	37
38. Musikinstrumente	38
39. Malen	39
40. Zeichnen	40
41. Schneiden	41
42. Kleben	42
43. Färben	43
44. Modellieren	44
45. Basteln	45
46. Kneten	46
47. Weben	47
48. Stricken	48
49. Nähen	49
50. Sticken	50
51. Glasmalerei	51
52. Keramik	52
53. Holz	53
54. Stein	54
55. Metall	55
56. Glas	56
57. Papier	57
58. Textilien	58
59. Leder	59
60. Kunststoff	60
61. Holzwerkstoffe	61
62. Metallwerkstoffe	62
63. Kunststoffwerkstoffe	63
64. Glaswerkstoffe	64
65. Textilwerkstoffe	65
66. Lederwerkstoffe	66
67. Holzwerkstoffe	67
68. Metallwerkstoffe	68
69. Kunststoffwerkstoffe	69
70. Glaswerkstoffe	70
71. Textilwerkstoffe	71
72. Lederwerkstoffe	72
73. Holzwerkstoffe	73
74. Metallwerkstoffe	74
75. Kunststoffwerkstoffe	75
76. Glaswerkstoffe	76
77. Textilwerkstoffe	77
78. Lederwerkstoffe	78
79. Holzwerkstoffe	79
80. Metallwerkstoffe	80
81. Kunststoffwerkstoffe	81
82. Glaswerkstoffe	82
83. Textilwerkstoffe	83
84. Lederwerkstoffe	84
85. Holzwerkstoffe	85
86. Metallwerkstoffe	86
87. Kunststoffwerkstoffe	87
88. Glaswerkstoffe	88
89. Textilwerkstoffe	89
90. Lederwerkstoffe	90
91. Holzwerkstoffe	91
92. Metallwerkstoffe	92
93. Kunststoffwerkstoffe	93
94. Glaswerkstoffe	94
95. Textilwerkstoffe	95
96. Lederwerkstoffe	96
97. Holzwerkstoffe	97
98. Metallwerkstoffe	98
99. Kunststoffwerkstoffe	99
100. Glaswerkstoffe	100

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

1.	EINLEITUNG	1
2.	SCHRIFTTUM	2
2.1	Vorkommen von Schimmelpilzen in Futtermitteln	2
2.1.1	Begriffsbestimmung, systematische Stellung und Verbreitung der Schimmelpilze	2
2.1.2	Befall von Getreide durch Schimmelpilze	4
2.1.3	Abhängigkeit des Verderbs durch Schimmelpilze von verschiedenen Faktoren	8
2.1.3.1	Wassergehalt	8
2.1.3.2	Temperatur	10
2.1.3.3	Lagerdauer	10
2.1.3.4	Gesundheitszustand vor der Lagerung	11
2.1.3.5	Insektenbefall	11
2.1.4	Keimgehalt und Artzugehörigkeit der Schimmelpilze	12
2.1.4.1	Höhe der Keimzahlen	12
2.1.4.2	Schimmelpilzarten	13
2.2	Bildung sekundärer Metaboliten beim Pilzstoffwechsel	16
2.2.1	Synthese von Stoffen mit antibiotischer bzw. toxischer Wirkung durch Aspergillen und Penicillien	19
2.3	Umsetzung von Antibiotika durch in Futtermitteln vorkommende Pilze	43
3.	EIGENE UNTERSUCHUNGEN	46
3.1	Material und Methoden	46
3.1.1	Herkunft der Schimmelpilzstämmen	46
3.1.2	Isolierung, Identifizierung und Aufbewahrung der Stämme	48
3.1.3	Untersuchung der Stämme auf die Bildung von Stoffwechselprodukten mit antibiotischer Wirkung	50
3.1.3.1	Anreicherung der Stämme vor der Bestimmung der antibiotischen Aktivität ihrer Stoffwechselprodukte	50
3.1.3.2	Bestimmung der antibiotischen Aktivität der Anreicherungsflüssigkeit unter Anwendung des Reihenverdünnungstestes	50

	Seite
3.1.3.3 Prüfung der Pilzkulturen auf das Vorhandensein von Metaboliten mit antibiotischer Aktivität	52
3.1.3.3.1 Extraktion der Anreicherungen in YES-Medium	52
3.1.3.3.2 Ermittlung der allgemeinen antibiotischen Aktivität des Extrakts unter Verwendung des Agardiffusionstestes	52
3.1.3.3.3 Nachweis spezieller Mykotoxine mit antibiotischen Eigenschaften durch Dünnschichtchromatographie	53
3.1.4 Untersuchung des Abbaues von Antibiotika durch Schimmelpilze	57
3.1.4.1 Kultivierung der Schimmelpilze und pH-Kontrolle	57
3.1.4.2 Bestimmung der Hemmhofgrößen der als N-Quelle angebotenen Antibiotika	60
3.1.4.3 Durchführung des Agardiffusionsverfahrens zum Nachweis der Veränderung der antibiotischen Aktivität des Substrates	60
3.2 Ergebnisse und deren Besprechung	61
3.2.1 Resultate der Untersuchung von Schimmelpilzen auf Bildung von Stoffwechselprodukten mit antibiotischer Wirkung	61
3.2.1.1 Bestimmung der antibiotischen Aktivität der Anreicherungsflüssigkeit	61
3.2.1.2 Ergebnis der Prüfung der antibiotischen Aktivität der Chloroformextrakte	70
3.2.1.3 Vergleich der Einzelergebnisse des Reihenverdünnungstestes mit denen des Agardiffusionstestes	79
3.2.1.4 Bildung von bestimmten antibiotischen Stoffen mit toxischer Wirkung	85
3.2.2 Resultate der Untersuchung auf Abbau von Antibiotika durch Schimmelpilze der Gattungen Aspergillus und Penicillium	85
3.2.2.1 Prüfung auf Abbau von Tetracyclin	87
3.2.2.2 Prüfung auf Abbau von Penicillin	92
3.2.2.3 Prüfung auf Abbau von Bacitracin	102
4. DISKUSSION	107
5. ZUSAMMENFASSUNG	111
6. LITERATURVERZEICHNIS	115
Lebenslauf	

1. EINLEITUNG

Mikroorganismen sind in pflanzlichen Produkten, wie sie auch Futtermittel darstellen, weit verbreitet.

Schimmelpilze der Gattungen *Aspergillus* und *Penicillium* nehmen dabei einen wichtigen Platz ein, da diese bei unsachgemäßer Lagerung von Futtermitteln bzw. deren Rohstoffen ökologische Faktoren vorfinden, die eine rasche Vermehrung dieser Pilze zulassen.

Schimmelpilze dieser Gattungen stellen äußerst stoffwechselaktive Mikroorganismen dar, die auf der einen Seite zur Synthese kompliziert gebauter, biologisch aktiver Verbindungen fähig sind, zum anderen verschiedene organische Substanzen als Kohlenstoff- oder Stickstoffquellen nutzen können.

Da Höchst- und Mindestgehalt von Antibiotika in Futtermitteln vom Gesetzgeber durch Verordnung bestimmt werden, und in der Praxis diese Werte bei gelagerten Handelsfuttermitteln oftmals über- bzw. unterschritten werden, sollte einmal untersucht werden, inwieweit aus Futtermitteln isolierte Schimmelpilze der Gattungen *Aspergillus* und *Penicillium* Einfluß auf das Vorkommen antibiotischer Substanzen haben.

Meine Aufgabe bestand darin, erstens zu untersuchen, ob und in welcher Quantität Pilze dieser Gattungen zur Bildung antibiotischer Substanzen fähig sind. Großer Wert wurde dabei auch auf den Nachweis bestimmter hepato- oder nephrotoxischer Mykotoxine mit teilweise carcinogenen Eigenschaften gelegt, die schon in äußerst geringen Konzentrationen eine Gefährdung des Gesundheitszustandes von Tieren darstellen können.

Zweitens sollte untersucht werden, ob aus Futtermitteln isolierte *Aspergillen* oder *Penicillien* in der Lage sind, vorgegebene antibiotische Stoffe zu inaktivieren bzw. als Stickstoffquelle nutzen zu können.

2. SCHRIFTTUM

2.1 Vorkommen von Schimmelpilzen in Futtermitteln

2.1.1 Begriffsbestimmung, systematische Stellung und Verbreitung der Schimmelpilze

"Pilze sind chlorophyllose, eukariontische Thallophyten" (MÜLLER und LOEFFLER, 1968).

Unter Schimmelpilzen werden eine große Gruppe von Mikroorganismen zusammengefaßt, die systematisch in verschiedene Klassen eingereiht werden (NIETHAMMER, 1947; MÜLLER, 1974). Gemeinsam ist ihnen in der Regel ein Vegetationskörper (Thallus), der aus feinen, fadenartigen Röhren (Hyphen) besteht, die miteinander vernetzen und ein Geflecht (Mycel) bilden. Dem unbewaffneten Auge zeigen sie sich als weiße oder farbige, dünne, flockige oder wollige Überzüge (MÜLLER, 1974). SNELL und DICK (1957) verstehen unter "Schimmelpilze" gewisse Pilzarten, deren Aussehen durch reichlich gebildetes Mycel "schimmelig" erscheint. Dieser "Schimmel" kann sowohl von einem Rasen steriler Hyphen als auch von einem Überzug fruktifizierender Konidienträger oder gar von einem Überzug mit Perithezien gebildet werden (LOEFFLER, 1965). Makromorphologische Wachstums-eigenschaften geben also den Ausschlag für eine Zusammenfassung verschiedener Klassen von Pilzen in einer Gruppe, die keiner im biologischen Sinne definierten Einheit entspricht.

Die Schimmelpilze gehören im wesentlichen zu der Klasse der Zygomyceten (z.B. Familie Mucoraceae) und der Klasse der Deuteromyceten (z.B. Familie Moniliaceae).

Ihre systematische Stellung soll in einer Übersicht nach VON ARX (1967) dargestellt werden (vgl. Abb. 1).

Die einzige Voraussetzung für das Wachstum von Pilzen in der Natur ist die gleichzeitige oder vorausgegangene Besiedelung durch andere Organismen. Deshalb sind Pilze praktisch überall anzutreffen, auch an Orten mit nur minimaler Nährstoffkonzentration (MÜLLER und LOEFFLER, 1968).

Außer im Wasser, das vor allem niederen Pilzen als Lebensraum dient, ist der natürliche Standort der meisten Pilze im Boden. Feuchtigkeit, Temperatur, pH und abgestorbene Pflan-

Abteilung:

Eumycota

Klasse:	Zygomycetes	Ascomycetes	Basidiomycetes	Deuteromycetes
Reihe:	Mucorales			Moniliales
Familie:	Mucoraceae	Dematiaceae		Moniliaceae
Gattung:	Mucor Absidia Rhizopus Thamnidium	Cladosporium		Penicillium Aspergillus Geotrichum Trichothecium

Abb. 1: Systematische Stellung der Schimmelpilze
(nach VON ARX, 1967)

zen- bzw. Tierreste bieten gute Lebensbedingungen (MÜLLER und LOEFFLER, 1968). Die im Boden anzutreffenden Pilze gehören im wesentlichen den Gattungen *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Absidia*, *Rhizopus*, *Trichoderma*, *Fusarium*, *Cladosporium* und *Zygorhynchus* an (LÖHNIS, 1936; KREHL-NIEFFER, 1951).

Es gibt Pilze, die ubiquitär vorkommen, während andere nur in bestimmten geographischen Gebieten auftreten (MÜLLER und LOEFFLER, 1968). Klimatische Faktoren bevorzugen die Ausbreitung der einen oder anderen Gattung. So nimmt die Gattung *Penicillium* nach Süden zu an Arten und Individuen ab, die Gattung *Aspergillus* dagegen zu (KREHL-NIEFFER, 1951; NIETHAMMER, 1947). Diese im Boden vorkommenden Schimmelpilzarten finden sich auf landwirtschaftlichen Produkten wieder, die auf diesem Territorium erzeugt worden sind (NIETHAMMER, 1939; SPICHER, 1973; SPICHER, 1974). SCHMIDT (1966) erklärt das häufige Vorkommen von *Aspergillus terreus*, einem Bodenpilz warmer Zonen, in Maniokfuttermitteln durch eine bodenbürtige Infektion im Erzeugerland.

2.1.2 Befall von Getreide durch Schimmelpilze

Getreide und Getreideprodukte (z.B. Futtermehle, Kleie) finden als Einzelfuttermittel und als Mischfuttermittelkomponenten in der Tierernährung Verwendung. Der Getreideanteil in Schweinemastalleinfutter z.B. schwankt zwischen 56% und 99% (KIRCH-GESSNER, 1970). Wie die übrigen Einzelkomponenten, so bringt auch das Getreide seine Keimflora in das Endprodukt ein (STANKOUSHEV, 1967); der Gesamtkeimgehalt jedoch wird von Mischfuttermitteln im wesentlichen vom Prozentsatz der zuge-mischten Getreideprodukte, insbesondere der schalentragenden Anteile, bestimmt (SCHMIDT, 1965). Die Getreidequalität wird somit zu einer bestimmenden Größe für die Mischfutterquali-tät (SCHMIDT, 1975).

Vor allem Pilze beeinflussen den Verderb von Getreidepartien, da diese sich schon bei einer geringen Produktfeuchte vermehren können (CHRISTENSEN, 1962; SCHMIDT, 1973). Bakterien gelangen erst zur Vermehrung, wenn die echten Pilze und Strahlenpilze durch aktive Wasserabscheidung - Guttation - den ursprünglichen Wassergehalt des Substrates heraufgesetzt haben (GEDEK, 1973). Es erscheint also bedeutend, vor allem die Mykoflora von Getreide näher zu erörtern.

Pilze kommen nicht nur auf der Oberfläche von Getreidekörnern vor (= äußere Mykoflora), sondern auch unter deren Epidermis (= innere Mykoflora) (CHRISTENSEN, 1951). Die äußere Hülle - das Pericarp - eines Getreidekornes besteht aus Exocarp, Mesocarp und Endocarp. Während der Reifung des Kornes zerfällt das Mesocarp, und der freiwerdende Raum zwischen Exocarp und Endocarp wird von der "inneren Mykoflora" besiedelt (HYDE und GALLEYMORE, 1951). CHRISTENSEN (1951) konnte auch noch Mycel auf der Innenseite des Pericarps nachweisen. Das Pilzmycel dringt in der Regel nicht in die Zellen ein, wenn auch vereinzelt in den Aleuronzellen und Querzellen Mycel nachgewiesen worden ist (NIETHAMMER, 1939). Im allgemeinen erscheinen die Hyphen als ein weitmaschiges Netzwerk, obwohl auch gelegentlich Sklerotien vorkommen. HYDE und GALLEYMORE (1951) prüften 5000 Getreidekörner aus verschiedenen Ländern, und nur in zwei oder drei Fällen konnten Sporen in geringer

Anzahl nachgewiesen werden.

Das Ausmaß des subepidermalen Mycels schwankt zwar in großer Breite, jedoch konnte festgestellt werden, daß der Grad des Befalls abhängig ist von der relativen Luftfeuchtigkeit während der Zeit der Reife. Proben aus Gegenden mit relativ hoher Luftfeuchtigkeit (z.B. West-Europa, Küstengebiete warmer Länder) zeigten einen höheren "inneren" Pilzbefall als Proben aus Gebieten mit relativ niedriger Luftfeuchtigkeit (Mittlerer Osten, Mexico) (HYDE, 1950).

Die subepidermale Mikroflora besteht in erster Linie aus Schimmelpilzen der Gattung *Alternaria*. Darüber hinaus sind neben verschiedenen Bakterien Pilze der Gattungen *Helminthosporium*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Cephalothecium*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Penicillium* und *Aspergillus* anzutreffen (HYDE und GALLEYMORE, 1951; NIETHAMMER, 1939). CHRISTENSEN (1951) konnte nachweisen, daß die beiden letzten Gattungen besonders häufig in Getreidepartien minderer Qualität vorkommen, während *Alternaria*-arten in Partien hoher Qualität vorherrschend sind.

Wie die "innere Schimmelpilzflora" besteht auch die "äußere Schimmelpilzflora" von Getreidekörnern aus Gattungen und Arten, die ihren primären Standort im Boden haben. Die Zusammensetzung der "äußeren Flora" wird jedoch stark durch die Lagerzeit beeinflusst; mit zunehmender Lagerungsdauer werden die ursprünglich dem reifen Getreide anhaftenden "Feldpilze" reduziert, und es kommt zu einem Anwachsen der sogenannten "Lagerpilze". Auf dem Halm stehendes bzw. frisch geerntetes Getreide weist als Schimmelpilzflora vornehmlich Arten der Gattungen *Alternaria*, *Fusarium*, *Cladosporium* und *Helminthosporium* auf (CHRISTENSEN, 1962). Diese Pilze sind nach MILLNER et al. (1947) nicht in der Lage, bei einer Kornfeuchtigkeit unter 25% zu wachsen; ihr Vorkommen wird bei einer Kornfeuchtigkeit um 18% relativ schnell reduziert.

Die "Lagerpilze" setzen sich hauptsächlich aus Vertretern der Gattungen *Aspergillus* und *Penicillium* zusammen. Darüber hinaus befallen Pilze der Gattungen *Absidia*, *Actinomucor*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Thamnidium* und *Zygorhynchus* Lagergetreide. Auf frisch geerntetem Getreide kommen diese Pilze entweder

als Spore auf der Oberfläche der Körner oder als "schlafendes Mycel" in den äußeren Zellschichten des Pericarp und der Schale vor. Diese sind in der Lage, schon ab einer Kornfeuchtigkeit von 13,5% zu wachsen und für den Verderb der Getreidepartie zu sorgen (MILLNER et al., 1947; CHRISTENSEN, 1962; SPICHER, 1973; SPICHER, 1974).

Nach PELHATE (1968) (ref. SPICHER, 1974) soll es darüber hinaus kurzfristig zur Ausbildung einer "Intermediärflora" kommen; diese trägt noch alle Züge der Feldflora, jedoch vermag sie sich auf lagerndem Getreide kurzfristig zu entwickeln, wenn von seiten der Feuchtigkeit des Getreidekornes hierzu die Voraussetzungen gegeben sind. Dies ist dann der Fall, wenn eine Getreidepartie mit zu hoher Feuchtigkeit geerntet wurde. Zu dieser Gruppe sind Vertreter der Gattungen *Cladosporium*, *Rhizopus*, *Aureobasidium* und *Hyalodendron* zu rechnen. Die Entwicklung der Schimmelpilzflora nach der Einlagerung des Getreides ist in einer Graphik nach PELHATE (1968) (ref. SPICHER, 1974) dargestellt (vgl. Abb. 2). Auffällig hierbei ist das frühe, jedoch nur kurzzeitig starke Vorkommen von *A.repens*, der von Anfang an hohe und kontinuierliche Befall mit *P.cyclopium*, während *Alternaria tenuissima* mit fortschreitender Lagerzeit immer weniger häufig nachzuweisen ist.

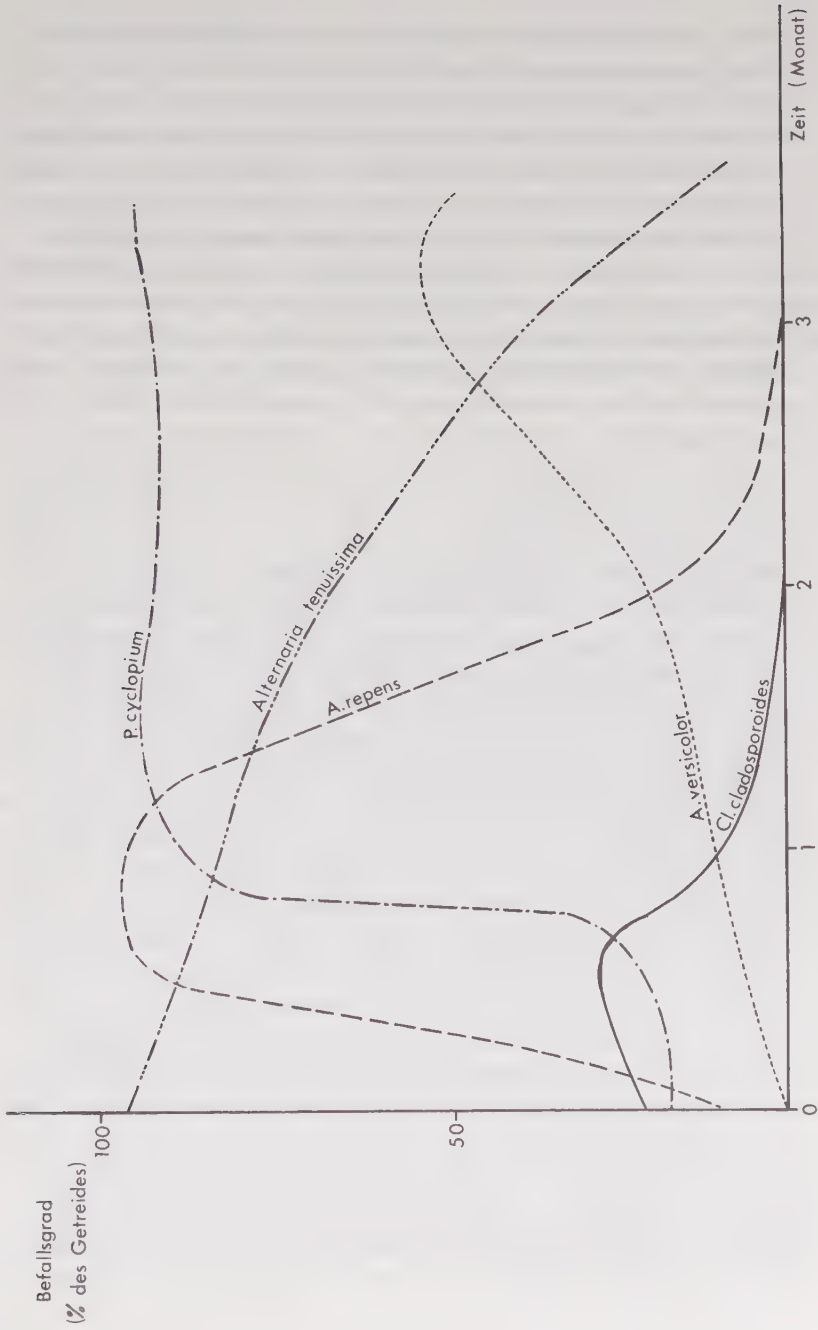


Abb. 2: Entwicklung der Schimmelpilzflora nach Einlagerung des Getreides nach PELHATE (ref. SPICHER, 1974)

2.1.3 Abhängigkeit des Verderbs durch Schimmelpilze von verschiedenen Faktoren

Für die Herstellung von Mischfutter wird in der Regel laufend Getreide aus Lagerbeständen verwendet (SCHMIDT, 1973). Während der Lagerung ist es verschiedenen Umwelteinflüssen ausgesetzt, die den Verderb durch Schimmelpilze einleiten bzw. beschleunigen können. Feuchtigkeitsgehalt, Lagertemperatur, Lagerzeit, Gesundheitszustand des Getreides vor der Einlagerung - insbesondere das Vorhandensein von Lagerpilzen vor der Einlagerung - und der Befall mit Insekten spielen hierbei eine wesentliche Rolle (CHRISTENSEN, 1962).

2.1.3.1 Wassergehalt

Die Getreidefeuchtigkeit hat einen großen Einfluß auf das Wachstum und die Zusammensetzung der Pilzflora (SORGER-DOMENIGG et al., 1955; CHRISTENSEN, 1957). Abgesehen von der Kornfeuchte zum Zeitpunkt der Ernte, wird der Wassergehalt von der relativen Luftfeuchtigkeit in den Lagersilos bestimmt. Weizen, der bei 60% relativer Luftfeuchtigkeit gelagert wird, weist einen Wassergehalt von ca. 13% auf. Steigt die Luftfeuchtigkeit auf 75% bzw. 90%, so steigt auch der des gelagerten Weizens auf 16,5% bzw. 23,9% (PANASENKO, 1967). Nach SPICHER (1974) soll die relative Luftfeuchtigkeit 65% bei langfristigem Lagern nicht übersteigen. Dieser Wert wird auch von RICHARDSON et al. (1961) für die Lagerung von Mischfuttermitteln empfohlen. SNOW (1945) stellte fest, daß Vertreter der *A.glaucus*-Gruppe ab einer relativen Luftfeuchtigkeit von 65% in der Lage sind, Futtermittel zu befallen. Penicillien konnte er ab einer relativen Luftfeuchtigkeit von 85% isolieren, wobei er stärksten Schimmelpilzbefall bei Werten zwischen 90% und 100% relativer Luftfeuchtigkeit feststellen konnte.

Zu lokalem Anstieg der Getreidefeuchtigkeit kann es durch schlecht isolierte Silos (Kondenswasserbildung) und Temperaturdifferenzen in der Getreidepartie (Feuchtigkeitsverschie-

bung von der wärmeren zur kälteren Stelle) kommen. Diese Orte mit erhöhtem Wassergehalt stellen dann Ausgangspunkte für einen Schimmelpilzbefall dar. Darüber hinaus sind Pilze selbst in der Lage, die Getreidefeuchtigkeit zu erhöhen. Bei ihrem Stoffwechsel erzeugen sie Wasser in Form von Guttationströpfchen, das zu einem Anstieg der Getreidefeuchtigkeit führt (CHRISTENSEN, 1957; GEDEK, 1973).

Eine Erhöhung der Getreidefeuchtigkeit bewirkt einen Anstieg der Schimmelpilzkeimzahlen (SORGER-DOMENIGG, 1955). Etwa 21% der von SPICHER (1956) untersuchten Weizenproben mit geringem bis mittlerem Wassergehalt hatten einen Schimmelpilzbefall von 16.550 Keimen/Gramm; Proben mit mittlerem bis hohem Wassergehalt wiesen in etwa 43% der Fälle diese Keimzahl auf.

Unterschiedliche Getreidefeuchtigkeit hat eine verschiedenartige Zusammensetzung der Schimmelpilzflora zur Folge. THOM und LE FEVRE (1921) fanden, daß Vertreter der *A.glaucus*-Gruppe in Maismehl zu wachsen beginnen, wenn der Wassergehalt über 12,5% - 13,0% steigt.

CHRISTENSEN (1957) gibt den "kritischen Wassergehalt" von Lagergetreide mit 13,5% an, da in diesem Bereich *A.restrictus* in der Lage ist, sich zu vermehren. Bei Feuchtigkeiten von 15,4% bis 16,3% entwickeln sich die Vertreter der *A.glaucus*-Gruppe (*A.amstelodami*, *A.chevalieri*, *A.repens*, *A.ruber*) am stärksten und treten bei Getreide mit einem Feuchtigkeitsgehalt von 17% in den Hintergrund (SPICHER, 1974). *A.versicolor*, *A.wentii* und *A.ochraceus* finden, wenn der Feuchtigkeitswert nur geringgradig höher liegt, optimale Wachstumsvoraussetzungen vor (KOEHLER, 1938). Der Befall mit *A.candidus* setzt bei einer Getreidefeuchtigkeit von 15% ein und kann bei einem Wassergehalt von 18,5 % bis 20,8% mehr als 75% der Schimmelpilzflora ausmachen (SPICHER, 1974). *A.flavus* kommt, wie auch *A.niger*, in der Regel in Getreide mit einem Feuchtigkeitsgehalt über 18% vor (KOEHLER, 1938); bei Werten über 20% kann er oft die vorherrschende Schimmelpilzspezies sein (SPICHER, 1974). Pilze der Gattungen *Penicillium*, insbesondere *P.cyclopium*, *P.palitans*, *P.notatum*, sind in Getreidepartien vorzufinden, deren Wassergehalt oberhalb von 18% liegt (KOEHLER, 1938; SPICHER, 1974). In diesem Bereich beginnen

auch die Vertreter der Intermediärflora, wie z.B. *Alternaria tenuissima* und *Cladosporium cladosporioides*, genügend Feuchtigkeit zum Wachstum vorzufinden (SPICHER, 1974).

2.1.3.2 Temperatur

Die Lagertemperatur spielt eine wesentliche Rolle beim Verderb von Getreide. PANASENKO (1944) teilt die Pilze in psychrotolerante, mesothermotolerante und thermotolerante Mikroorganismen ein. Zu der Gruppe der thermotoleranten gehören nur wenige Pilze, die jedoch große wirtschaftliche Schäden hervorrufen können. Sie befallen Getreide und andere Futtermittel in einem Temperaturbereich von 20°-60°C und führen durch ihren Stoffwechsel zu einem Anstieg der Lagertemperatur (PANASENKO, 1967). CHRISTENSEN (1957) berichtet von einigen *A.flavus*-Stämmen, die bei Temperaturen um 45°C noch gut wachsen; einige *A.candidus*-Stämme sollen sogar bei Temperaturen um 55°C dazu noch in der Lage sein.

Die meisten Pilze, die für Lagerschäden in Betracht kommen, gehören der Gruppe der mesothermotoleranten Mikroorganismen (5°-35°C) an (PANASENKO, 1967), wobei sie bei Temperaturen um 20°-35°C beste Wachstumsbedingungen vorfinden (SPICHER, 1974). Bei sinkenden Temperaturen kommt es in der Regel zu einer Abnahme der Wachstumsintensität. Es gibt jedoch *Penicillien*-arten, wie z.B. *P.cyclopium* und *P.viridicatum*, die feuchten Mais auch bei Temperaturen von -2°C befallen können (MISLIVEC und TUIITE, 1970).

2.1.3.3 Lagerdauer

Wassergehalt, Temperatur und Lagerzeit stehen in enger Wechselwirkung mit dem Wachstum von Schimmelpilzen. Je höher Getreidefeuchtigkeit und Temperatur - innerhalb der physiologischen Grenzen - desto eher tritt ein Verderb durch Lagerpilze ein (CHRISTENSEN, 1957).

THALMANN (1971) stellte fest, daß es bei der Lagerung von

Futtermitteln zu einem Anstieg der Pilzkeimzahlen kommt, die jedoch nach dem Erreichen eines maximalen Wertes wieder abfallen. Die Zeitspanne bis zum Auftreten höchster Pilzkeimzahlen ist dabei abhängig von dem Wassergehalt des lagernden Produktes.

CHRISTENSEN (1957) gibt an, daß Weizen mit einem Feuchtigkeitsgehalt von 14,5% bis 15,0% bei einer Temperatur von 20°-25°C einige Monate, bei 10°-15°C bis zu einem Jahr ohne größeren Schaden gelagert werden kann.

2.1.3.4 Gesundheitszustand vor der Lagerung

Zusammensetzung und Ausmaß der mikrobiellen Flora und der "Besatz" von Getreide vor der Lagerung beeinflussen seine Lagerfähigkeit. "Besatz" ist kein einheitlicher Begriff, sondern man versteht darunter sämtliche Bestandteile einer Getreidepartie, die nicht einwandfreies Grundgetreide sind. Daher läßt sich "Besatz" weiter in den "Schwarzbesatz" (verdorbene Körner, Brandbutten, Spelzen, Verunreinigungen, Insektenfragmente und Käfer) und den "Kornbesatz" (= Menge des Bruchkornes, Schmachkornes, Fremdgetreides, Auswuchses, Schädlingsfraßes und der Keimverfärbung) aufteilen.

Den weitaus größeren Einfluß auf die Mikroflora hat der Kornbesatz. Er erhöht vor allem die Bakterienkeimzahl (SPICHER, 1956, 1958). Abgestorbene Spelzen (Schwarzbesatz) bieten durch ihre starke Hygroskopizität eine gute Voraussetzung für das Angehen von Schimmelpilzinfektionen (SPICHER, 1974).

Ist Getreide vor der Einlagerung stark mit Lagerpilzen befallen, die auch bei Temperaturen von 10°-15°C ihr Wachstum weiterhin fortsetzen, so wird innerhalb weniger Monate der Feuchtigkeitsgehalt und die Temperatur zunehmen und zum Verderb des Getreides führen (CHRISTENSEN, 1962).

2.1.3.5 Insektenbefall

Insekten und Milben erhöhen durch ihre Stoffwechselaktivität den Feuchtigkeitsgehalt und die Lagertemperatur von Getreide.

So kann der Befall mit *Sitophilus granarius* zu einer Erhöhung des Wassergehaltes um 1% binnen einer Woche führen (CHRISTENSEN, 1962). Darüber hinaus tragen Insekten als lebende Vektoren zu einer Einschleppung und Verbreitung von Sporen in Getreide bei (SPICHER, 1974).

Neben den hier näher beschriebenen Faktoren beeinflussen Sauerstoffversorgung, CO_2 -Konzentration und Nährstoffangebot nicht unerheblich das Angehen von Lagerpilzen in Getreide. Außerdem ist die gegenseitige Konkurrenz der Schimmelpilze und der übrigen Mikroorganismen (Antibiose - Symbiose) ein wesentlicher Faktor für das Zustandekommen der Keimflora in Getreide.

2.1.4 Keimgehalte und Artzugehörigkeit der Schimmelpilze

2.1.4.1 Höhe der Keimzahlen

Das Keimvorkommen in Futtermitteln hängt von dem wechselvollen Schicksal ab, dem die Futtermittel bzw. ihre Rohstoffe bei der Herstellung und Verarbeitung unterworfen sind (SCHMIDT, 1965).

Pflanzliche Futtermittelkomponenten weisen einen umfangreichen Besatz mit Mikroorganismen (Gelbkeime, Schimmelpilze) auf. Fisch-, Tier-, Blut- oder Knochenmehl zeigen in frischem Zustand keine oder nur eine sehr geringe Mikroflora, da ihr Keimgehalt durch Sterilisierung oder stärkere Erhitzung beim Herstellungsprozeß reduziert wird. Diese Keimarmut ist jedoch nicht von langer Dauer, da es bald zu einer Reinfektion aus der Umgebung kommt (SCHMIDT, 1974). Als Hauptquelle für die Besiedelung bzw. Verunreinigung können nach SCHMIDT (1968) folgende natürliche Reservoirs angegeben werden:

- a) die Bodenmikroflora
- b) die Mikroflora von Blatt-, Körner- und Samenoberflächen der Futterpflanzen
- c) die lokalen Keimbiopten von Futtermittelverarbeitungs- und Lagerstätten

d) die Intestinalflora von Tieren und Menschen

Wie stark die Kontamination von Futtermitteln mit Pilzen ist, soll anhand einer Übersicht nach SCHMIDT (1974) dargestellt werden (vgl. Tabelle 1).

Aus dieser Tabelle geht hervor, daß bei Futterstoffen pflanzlicher oder dominierend pflanzlicher Herkunft stärker mit hohen Pilzkeimgehalten gerechnet werden muß als dies bei Futterkomponenten tierischen Ursprungs der Fall ist. Getreidekörner, Schrote und Kleien sind zu ca. 43% mit Keimgehalten über 100 000 Keime/Gramm befallen. Ähnlich hoch liegen die Keimzahlen für Mais (ca. 41%) und ungepreßte Tapiokaprodukte (ca. 45%). Durch Vermahlung (Entfernung der Schalen) und Pelletieren (Erhitzung) wird eine deutliche Reduzierung hoher Keimgehalte erreicht (Getreidefuttermehle 9,1%, Tapiokapellets 20%). Tierische Futtermittel (Fischmehl, Tiermehl) zeigen dagegen weniger häufig hohe Pilzkeimgehalte (10,3% bzw. 5,6%).

SCHMIDT (1968) konnte in ungepreßtem Geflügelmischfutter in 43 von 100 Fällen Pilzkeimgehalte über 100 000 Keime/Gramm nachweisen. In 40% schwankten sie zwischen 30 - 100 000, während er in 17% der Proben Keimzahlen unter 30 000 fand.

MILITZER (1968) untersuchte das Schimmelpilzvorkommen in Maissilage. Rand und Oberflächensilage schlechter Qualität waren im Durchschnitt mit 59 Mrd. Schimmelpilzkeimen/Gramm befallen, gute Zentrumsilage dagegen nur mit ca. 1500 Keimen/Gramm.

2.1.4.2 Schimmelpilzarten

In Futtermitteln sind Pilze verschiedenster Gattungen nachgewiesen worden. Außer Aspergillen und Penicillien, Pilzarten, die in erster Linie den Verderb von Futtermitteln hervorrufen können, sind Vertreter der Gattungen *Alternaria*, *Cephalosporium*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Epicoccum*, *Helminthosporium*, *Mucor*, *Rhizopus* und *Trichoderma* isoliert worden.

Auf dem Felde stehende erntereife Weizen- und Gerstenkörner weisen als Pilzbesatz vornehmlich *Alternaria alternata*,

Tabelle 1: Gruppierung von Handelsfuttermitteln nach dem Keimgehalt (nach SCHMIDT, 1974)

Futterart	Proben- anzahl	≤ 50*						> 150		
		≤ 25	25-50	50-75	75-100	100-150	100-150	150-200	200	> 200
Getreide, Getreide- schrote, Kleien	224	34,0%	12,9%	5,3%	4,5%	5,8%	10,3%	27,2%		
Futtermehle	44	72,7%	9,1%	6,8%	2,3%	6,8%	-	2,3%		
Mais	97	35,1%	10,3%	4,1%	9,3%	7,2%	8,2%	25,8%		
<u>Schweinefutter:</u>										
Mehle	283	17,0%	24,7%	13,8%	7,4%	8,8%	6,4%	21,9%		
Preßfutter	94	93,6%	1,1%	-	-	-	-	5,3%		
Fischmehle	78	82,0%	7,7%	-	-	1,3%	9,0%			
Fleischknochen- Tiermehle	36	94,4%	-	-	-	-	5,6%			
Tapioka-Mehle, Chips	135	41,5%		13,3%		5,9%	6,6%	32,6%		
Pellets	35	71,4%		8,5%		2,9%	-	17,1%		

* Keimzahlen in 1000

Cladosporium cladosporioides, *Cl. herbarium*, *Epicoccum nigrum* und *Fusarium avenaceum* auf (FLANNIGAN, 1974).

In Weizenproben, die maximal 6 Wochen gelagert waren, wies FLANNIGAN (1970) Pilze der gleichen Gattungen nach, jedoch war ihr Vorkommen nicht mehr so stark. Darüber hinaus waren 19% der untersuchten Weizenkörner mit Pilzen der *A.glaucus*-Gruppe (*A.amstelodami*, *A.chevalieri*, *A.repens*, *A.ruber*) und zu 41% mit *Penicillien* verschiedener Arten befallen. Eine ähnliche Zusammensetzung zeigte die Pilzflora von Gerste und Hafer, die unter gleichen Bedingungen gelagert waren; auffallend im Vergleich zum Weizen war das wesentlich stärkere Vorkommen von *A.fumigatus* und *A.candidus*. Andere *Aspergillus*-Spezies, wie *A.nidulans*, *A.niger*, *A.terreus*, *A.versicolor* und *A.flavus*, waren nur in geringer Anzahl zu isolieren. Auf Gerste, die 4 Monate gelagert war, dominierten *P.cyclopium*, *P.roqueforti* und *P.expansum*. *Absidia corymbifera*, *A.flavus*, *A.terreus*, *P.corylophilum*, *P.stoloniferum*, *P.puberulum* und *P.spinulosum* konnten nur vereinzelt nachgewiesen werden (MULING und CHESTERS, 1970).

SCHMIDT (1975) konnte feststellen, daß Getreideprodukte häufig mit *A.candidus* und *A.flavus* befallen sind. 34,5% bzw. 22,8% des untersuchten Probenmaterials wiesen diese Pilze auf; in 15,8% bzw. 5,1% konnte er *P.rubrum* und *A.niger* isolieren.

SPESIVICEVA (1968) untersuchte die Pilzflora von frischeingebrachtem Körnermais. Neben einer großen Anzahl verschiedener *Fusarien*- und *Cephalosporium*arten hatten *A.fumigatus*, *A.niger* und *A.ochraceus* den Mais schon vor der Lagerung befallen.

Auf feuchtem lagernden Körnermais sind nach MISLIVEC und TUIITE (1970) insbesondere *Penicillien* für den Verderb verantwortlich. Vorherrschend sind neben 15 weiteren Arten *P.cyclopium*, *P.brevicompactum*, *P.oxalicum*, *P.funiculosum* und *P.viridicatum*.

In Maissilage ist mit häufigem Vorkommen von *A.fumigatus* zu rechnen (MILITZER, 1968; LEVENBERG, 1966).

A.niger, *A.ochraceus* und *A.flavus* wurden weniger oft vorgefunden. Vereinzelt wurden Pilze der Gattungen *Penicillium*, *Mucor* und *Trichoderma* isoliert.

Aus Grassilage züchteten SCURTI et al. (1968), *P.palitans*,

P.cyclopium, *P.janthinellum* und *Absidia spec. an.*

Heu war von *A.nidulans*, *A.niger*, *P.cyaneo-fulvum*, *P.cyclopium*, *P.roqueforti*, *P.roseo-purpureum*, *P.viridicatum* und *P.rugulosum* befallen (SCURTI et al., 1968).

In Maniokfuttermittel waren nach SCHMIDT (1966) *A.flavus*, *A.fumigatus* und *A.terreus* die häufigsten Arten. Darüber hinaus sind *A.unguis*, *A.versicolor*, *Gliomastix convoluta* und *Tritirachium roseum* typische Besiedler von Tapiokaprodukten. *A.candidus*, *A.niger*, *A.repens*, *A.chevalieri*, *P.rubrum*, *Trichothecium roseum*, *Pullularia pullulans* waren ebenso nachzuweisen wie Pilze der Gattungen *Mucor* und *Rhizopus*.

2.2 Bildung sekundärer Metaboliten beim Pilzstoffwechsel

Pilze vermehren sich allgemein gleichmäßig, solange Nährstoffe und Spurenelemente und gegebenenfalls Wachstumsfaktoren in genügenden und ausgewogenen Mengen zur Verfügung stehen (LOEFFLER und MÜLLER, 1968).

Die Stoffwechselvorgänge laufen unter diesen Bedingungen über den "Primärstoffwechsel" ab, der in seiner Grundstruktur bei allen Lebewesen gleich ist und der als die Summe untereinander verbundener Reihen enzymatisch gesteuerter Reaktionen zu bezeichnen ist, die dem Organismus Energie, Zwischenprodukte und Schlüsselmoleküle wie Proteine und Desoxyribonukleinsäure bereitstellen (TURNER, 1971). Geringfügige Verschiebungen dieser Bedingungen vermag der Primärstoffwechsel abzufangen, während stärkere Änderungen im Rahmen des physiologischen Bereiches das Erscheinen außergewöhnlicher Stoffwechselprodukte (sekundärer Metaboliten) zur Folge haben (LOEFFLER und MÜLLER, 1968). Diese sekundären Metaboliten scheinen keine offensichtliche Rolle im Energiehaushalt der Mikroorganismen zu spielen (TURNER, 1971). "Wenn das Vermehrungswachstum durch einen ungünstigen Umstand gestoppt wird, werden einige Teile des primären Stoffwechselnetzes unmittelbar und dramatischer betroffen sein als andere; dadurch wird ein Mangel an Gleichgewicht im System hervorgerufen, und es scheint die unmittelbare Ursa-

che für die Einleitung sekundärer Stoffwechselvorgänge zu sein. Zwischenstufen, die normalerweise in niedrigen Konzentrationen vorhanden sind, neigen dazu sich vorübergehend anzuheufen bis der Stoffwechseldruck durch Einleitung und Entwicklung neuer synthetischer Stoffwechselwege nachläßt" (BU LOCK, 1970). Weniger die Eigenschaften der dabei entstehenden Metaboliten (z.B. antibiotische Wirkungen) scheinen für ihre Produzenten von primärer Bedeutung zu sein, als vielmehr die Möglichkeit, durch deren Synthese sich veränderten Lebensbedingungen anzupassen (BU LOCK, 1970).

Die Zusammenhänge zwischen dem Primär- und dem Sekundärstoffwechsel soll in einer Abbildung nach BU LOCK (1970) dargestellt werden.

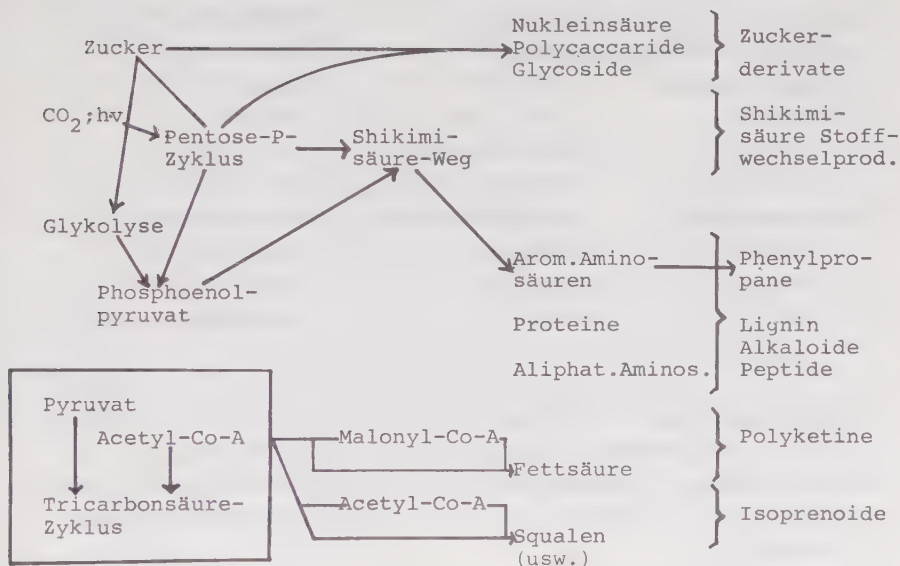


Abb. 3: Der Hauptfluß des Kohlenstoff-Stoffwechsels (links), die Hauptprodukte der primären Synthese (Mitte) und die entsprechenden Gruppen der sekundären Stoffwechselprodukte (rechts) (BU LOCK, 1970).

Eine genauere Zugehörigkeit sekundärer Metaboliten von Pilzen zu verschiedenen Stoffklassen organischer Verbindungen wird in Tabelle 2 nach DETROY, LILLEHOJ und CIEGLER (1971) wiedergegeben.

Tabelle 2: Zugehörigkeit sekundärer Metaboliten von Pilzen zu verschiedenen Stoffklassen organischer Verbindungen nach DETROY, LILLEHOJ und CIEGLER (1971).

Anthrachinone	Lactone	Pyridine
Aziridine	Macrolide	Pyrone
Benzochinone	Naphthalene	Pyrrole
Cumarine	Naphthachinone	Pyrroline
Diazine		Pyrrolizine
Epoxide	Perylene	Chinoline
Ergotalkaloide	Phenazine	Chinolinole
Flavonoide	Phenoxazinone	Chinone
	Phthaldehyde	
Hydroxylamine	Piperazine	Terpenoide
Indolderivate	Polyacetylene	Tetracycline
	Polyene	Tetronsäuren
	Pyrazine	Triazine
		Tropolone

Substanzen dieser Art sind Produkte von Stoffwechselleistungen, zu denen Pilze in "extremen Situationen" fähig sind. Sie sind vielfach antibiotisch wirksam und sind als solche bei den Antibiotika einzureihen oder aber auch als Mykotoxine anzusprechen.

Als besonders aktiv in der Bildung solcher sekundärer Metaboliten gelten von den Schimmelpilzen die Penicillien und Aspergillen.

2.2.1 Synthese von Stoffen mit antibiotischer bzw. toxischer Wirkung durch Aspergillen und Penicillien

Antibiotika sind Stoffe biologischen Ursprungs, die, ohne Enzymcharakter zu besitzen, in geringen Konzentrationen Wachstumsvorgänge hemmen (ZÄHNER, 1965).

WAKSMAN (ref. ZÄHNER, 1965) faßte diesen Begriff enger und verstand darunter Stoffe, die von Mikroorganismen gebildet werden und andere Mikroorganismen am Wachstum hindern.

LEISTNER (1974) bezeichnet Substanzen, die für Mikroorganismen toxisch sind, als Antibiotika; Stoffe, die von Schimmelpilzen gebildet werden und vor allem Mensch, Tier oder Pflanzen schädigen, nennt er dagegen Mykotoxine.

KORZYBSKI und KURYLOWICZ (1961) beschreiben 131 mehr oder weniger eindeutig charakterisierte Antibiotika, die durch Pilze synthetisiert werden können. Über 80 verschiedene Mykotoxine und über 400 toxinogene Schimmelpilzarten sind bisher bekannt geworden (LEISTNER, 1974).

Die folgende Übersicht soll veranschaulichen, in welcher Vielfalt Pilze der Gattungen *Aspergillus* und *Penicillium* in der Lage sind, Stoffe mit antibiotischen bzw. toxischen Aktivitäten zu bilden. Es wurde dabei versucht, die Stoffe nach den von DELCAMBE (1964) geforderten Kriterien zu beschreiben. Es ist jedoch einschränkend dazu anzuführen, daß nicht jeder Stamm eines potentiellen Antibiotika- bzw. Toxinbildners zur Synthese dieser Stoffe fähig ist (ORTH, 1972).

Nährstoffangebot und ökologische Faktoren (Temperatur, Substratfeuchtigkeit, Kulturzeit, pH-Wert) beeinflussen außerdem das Ausmaß der jeweiligen Produktion dieser Schimmelpilzmetaboliten (JARVIS, 1971; FRANK, 1974).

Tabelle 3: Bekannte Metaboliten von Schimmelpilzen der Gattungen Aspergillus und Penicillium mit antibiotischer Aktivität und teilweise gleichzeitiger Toxizität gegenüber Makroorganismen.

Substanz	Produzenten	Chem.-physikal. Daten	Biolog. Eigenschaften	Literatur
Aflatoxine	A.flavus A.parasiticus	Aflatoxin B ₁ : Summenformel: C ₁₇ H ₁₂ O ₆ Schmelzpunkt: 268-269°C; UV-Absorptionsspektrum: Maximum bei 362-363 nm (ε 21800); Aflatoxin B ₂ : Summenformel: C ₁₇ H ₁₄ O ₆ Schmelzpunkt: 286-289°C; UV-Absorptionsspektrum: Maximum bei 362-363 nm (ε 23400); Aflatoxin G ₁ : Summenformel: C ₁₇ H ₁₂ O ₇ Schmelzpunkt: 244-246°C UV-Absorptionsspektrum: Maximum bei 362-363 nm (ε 16100); Aflatoxin G ₂ : Summenformel: C ₁₇ H ₁₄ O ₇ Schmelzpunkt: 237-240°C UV-Absorptionsspektrum: Maximum bei 362-363 nm (ε 21000); Aflatoxin M ₁ : Summenformel: C ₁₇ H ₁₂ O ₇ Schmelzpunkt: 299°C UV-Absorptionsspektrum: Maximum bei 357 nm (ε 19000); Aflatoxin M ₂ : Summenformel: C ₁₇ H ₁₄ O ₇	Verhältnismäßig geringe Wirkung gegenüber Mikroorganismen; MHK-Werte (B ₁) Bacillus subtilis PCI 219: 100 mcg/ml; Streptomyces aureofaciens IFM 1042: 50 mcg/ml; Nocardia asteroides IFM 1: 10 mcg/ml; Nocardia leishmanii IFM 27: 50 mcg/ml; Bacillus stearotheophilus 50 mcg/ml (B ₁ +B ₂); die Pilze A.niger, Cladosporium herbarum, Thamnidium herbarum, Mucor hiemalis und Rhizopus nigricans werden von 100 mcg/Testplättchen gehemmt. Toxizität: Stark hepatotoxisch (zentrolobuläre Nekrosen), nephrotoxisch (Glomerulonephritis) u. carcinogen; LD ₅₀ Maus: 9 mg/kg oral; Meerschweinchen: 1,4 mg/kg oral; Ratte: 7,4-17,9 mg/kg oral; Entenküken 1 Tag alt: 0,335 mg/kg oral; 0,015 ppm in Rattenfutter erhöht deutlich Häufigkeit von Leberkarzinombildung.	ARAI, ITO und KOYAMA, 1967; GOLDBLATT, 1969; REISS, 1971; NIEBERLE und COHRS, 1970; BUTLER, 1974; REISS, 1975;

Substanz	Produzenten	Chem.-physikal. Daten	Biolog. Eigenschaften	Literatur
Albidin	P.albidum	Glänzende, nadelförmige Kristalle; Summenformel: $C_5H_5O_2$ Löslich in Äthanol, Pyridin, Eisessig, Dioxan; äußerst instabil	Stark wirksam gegen Pilze; MHK-Wert: Botryt.alii 0,2 mcg/ml; verschiedene Aspergillen, Penicillien und Fusarien unter 5 mcg/ml; Micrococcus pyogenes var. aureus 25 mcg/ml	BRUNNER und MACHEK, 1970; DELCAMBE, 1967
Aspergill-säure	A.flavus	Gelbe, plättchenförmige Kristalle; Summenformel: $C_{12}H_{20}O_2N_2$ Löslich in Äthanol, Chloroform, Pyridin, Eisessig; Schmelzpunkt: $93^\circ C$ Optische Aktivität: $(\alpha)_D^{24} = +13,4^\circ$ /Äthanol) UV-Absorptionsspektrum: Maxima bei 234 u. 328 nm	Ziemlich breites antibiotisches Spektrum; MHK-Wert: Bakterien 10-60 mcg/ml; Pilze 50-200 mcg/ml; Toxizität: LD ₅₀ Maus: 150 mg/kg i.p. 250 mg/kg p.o.	KORZYBSKI und KURYLOWICZ, 1961; BILAI, 1963; DELCAMBE, 1967
Aspergillin	A.niger	Farbstoff von A.niger	Sowohl gegen gram + als auch gegen gram - Keime in Konzentrationen von 200-1000 mcg/ml wirksam; stark toxisch	BRUNNER und MACHEK, 1970;
Asperlin	A.nidulans	In organischen Lösungsmitteln gut löslich; Schmelzpunkt: $71-73^\circ C$ Optische Aktivität: $(\alpha)_D^{25} = +345^\circ$ UV-Absorptionsspektrum: Maximum bei 204 nm;	80-100 mcg/ml sind gegen Pilze und Bakterien wirksam.	BRUNNER und MACHEK, 1970; DELCAMBE, 1967

Substanz	Produzenten	Chem.-physikal. Daten	Biolog. Eigenschaften	Literatur
Atrovenetin	P. herquei P. atrovenetum	Plättchenförmige Kristalle Summenformel: $C_{19}H_{18}O_6$ Schmelzpunkt: $295^{\circ}C$ Optische Aktivität: $(\alpha)_D^{25} = +73^{\circ}$ (Triacetat)	Wirkt gegen Staphylococcus aureus und Bacillus subtilis;	BRUNNER und MACHEK, 1970; DELCAMBE, 1967;
Aurantidin	A. parasiticus	Stickstoffhaltige, orangefarbene Verbindung;	Wirkt gegen gram+ und gram- Keime;	BRUNNER und MACHEK, 1970;
Candidulin	A. candidus	Farblose, nadelförmige Kristalle; Summenformel: $C_{11}H_{15}O_3N$ Löslich in Methanol, Äthanol, Aceton, Äther und Chloroform; Schmelzpunkt: $88-89^{\circ}C$ Optische Aktivität: $(\alpha)_D^{24} = +15^{\circ}$ (Chloroform) Inaktivierung durch alkal. Lösungen und Blut;	Wirksam gegen gram+ und gram- Keime, vor allem gegen Mycobakterien; MHK-Wert: Mycobacterium smegmatis 2,5 mcg/ml; Micrococcus pyogenes var. aureus 320 mcg/ml; Hefen, Aspergillen- und Penicillienarten werden ebenfalls gehemmt; MHK-Wert: A.fumigatus 80 mcg/ml; Toxizität: LD_{50} Maus: 250 mg/kg s.c.	KORZYBSKI und KURYLOWICZ, 1961; BILAI, 1963; DELCAMBE, 1967; BRUNNER und MACHEK, 1970;
Canescein	P. canescens	Farblose, nadelförmige Kristalle; Summenformel: $C_{15}H_{14}O_7$ Nur schwach löslich in organischen Lösungsmitteln und Wasser; Schmelzpunkt: $201-202^{\circ}C$ Molekulargewicht: 279; zerfällt bei alkal. pH	Wirkt gegen gram+ Mikroorganismen in Konzentrationen zwischen 25-100 mcg/ml; im gleichen Bereich wirkt es gegen Pilze der Gattungen Ascidia, Aspergillus, Penicillium und Fusarium;	KORZYBSKI und KURYLOWICZ, 1961; BILAI, 1963; BRUNNER und MACHEK, 1970;

Substanz	Produzenten	Chem.-physikal. Daten	Biolog. Eigenschaften	Literatur
Carneolutescin	P.carneolutescens	Ölige Substanz; löslich in Benzol, Äthanol und Äther; im alkal. Bereich instabil;	Wirkt gegen gram+ und gram- Keime; MHK-Wert: Micrococcus pyogenes var. aureus 0,7 mcg/ml; Blutse- rum reduziert die Aktivität um 50%;	KORZYBSKI und KURYLOWICZ, 1961; BILAL, 1963;
Citreoviridin	P.citreo-viride Eupenicillium ochrosalmoneum P.pulvillorum P.ochrasalmo- neum	Gelbe Kristalle; Summen- formel: $C_{23}H_{30}O_6 \cdot CH_3OH$ Löslich in Äthanol, Äther, Benzol, Chloroform, Azeton; Schmelzpunkt: 107-111°C Optische Aktivität: $(\alpha)_D^{20} = -107^\circ$ (Chloro- form) UV-Absorptionsspektrum: Maxima bei 204, 234; 286, 294, 388 nm;	Neurotoxin LD ₅₀ Maus: 11 mg/kg s.c. 7,5 mg/kg i.p. 29 mg/kg oral	UENO, 1974;
Citrinin	P.lividium P.implicatum P.fellutanum P.citreo-viride P.velutinum P.canescens P.jenseni P.citrinum P.steckii- -zaleski P.notatum P.viridicatum	Gelbe, nadelförmige Kri- stalle; Summenformel: $C_{13}H_{14}O_5$ Löslich in Äthanol, Aceton und Chloroform; Schmelzpunkt: 170-171°C Optische Aktivität: $(\alpha)_D^{22} = -27,7^\circ$ $(\alpha)_D^{22} = -31,5^\circ$ 578 $(\alpha)_D^{21} = -46,1^\circ$ 546	Wirkt stärker gegen gram+ als gegen gram- Keime; MHK-Wert: Micrococcus pyogenes var. aureus 6-100 mcg/ml; Salmonella typhimurium 110-250 mcg/ ml; Escherichia coli 500 mcg/ml; Toxizität: Stark nephrotoxisch;	KORZYBSKI und KURYLOWICZ, 1961; BILAL, 1963; DELCAMBE, 1967; KROGH et al., 1970; KROGH, 1974;

Substanz	Produzenten	Chem.-physikal. Daten	Biolog. Eigenschaften	Literatur
(Citrinin)	P. pallians P. expansum P. claviforme P. chrysosporium P. citreum P. sulfuratum P. phaeo-janthinellum A. candidus A. niveus A. terreus	(c. 0,66 in absoluten Äthanol)	LD ₅₀ Maus: 35 mg/kg s.c. oder i.p. 200-500 mg/kg oral; LD ₅₀ Ratte: 67 mg/kg s.c. LD ₅₀ Meerschweinchen: 37 mg/kg s.c. LD ₅₀ Kaninchen: 19 mg/kg s.c.	
Cyclochlorotine	P. islandicum	Weisse, nadelförmige Kristalle; Summenformel: $C_{25}H_{36}N_5O_8Cl_2$ Schmelzpunkt: 251°C Optische Aktivität: $(\alpha)_D^{16} = -92,9^\circ$ UV-Absorptionsspektrum: Maximum bei 257 nm;	Toxizität: Hepatotoxisch: LD ₅₀ Maus: 6,55 mg/kg oral 0,47 mg/kg s.c. 0,33 mg/kg i.v.	ENOMOTO und UENO, 1974;
Cyclopaldsäure	P. cyclopium P. cyclopium var. album P. viridicatum	Farblose Substanz; Summenformel: $C_{11}H_{10}O_6$ Schwach löslich in Äthanol Methanol und Äthylacetat; Schmelzpunkt: 224-225°C	Besitzt fungistatische Wirkung: 2,5 mcg/ml hemmen das Auskeimen von Botrytis allii-Sporen.	KORZYBSKI und KURYLOWICZ, 1961; DELCAMBE, 1969a; BRUNNER und MACHEK, 1970;
Cyclopiasäure	P. cyclopium	Farblose Kristalle; Summenformel: $C_{20}H_{20}N_2O_3$ Schmelzpunkt: 246°C	Toxizität: Neurotoxin; Milz- und Nierennekrosen;	HOLZAPFEL, 1971; PURCHASE, 1974;

Substanz	Produzenten	Chem. physikal. Daten	Biolog. Eigenschaften	Literatur
(Cyclopiazon- säure)		UV-Absorptionsspektrum: Maxima bei 225, 253 und 284 nm;	LD ₅₀ Ratte: 2,3 mg/kg i.p. 36-63 mg/kg oral;	
Decumbin (= Cyanein)	P.cyaneum P.simplificissimum P.brefeldianum P.decumbens	Farblose, nadelförmige Kristalle; löslich in Äthanol; Schmelzpunkt: 200-204°C Optische Aktivität: (α) _D ²⁴ = 94° (Äthanol) UV-Absorptionsspektrum: Maximum bei 216 nm;	Wirksam gegen Hefen; nicht gegen Bakterien und Protozoen; Toxizität: LD ₅₀ Maus: 275 mg/kg oral;	DELCAMBE, 1969a; BRUNNER und MACHEK, 1970; WILSON, 1971a;
Estin	P.paxilli var. echinulatum P.estinogenum	Summenformel: C ₁₆ H ₁₄ O ₆ Cl ₂ Schmelzpunkt: 223-225°C	MHK-Werte: Micrococcus pyogenes var.aureus 1,25 mcg/ml; Sarcina lutea 2,5 mcg/ml; Mycobacterium tubercu- losis 25-50 mcg/ml;	KORZYBSKI und KURYLOWICZ, 1961; BILAI, 1963; DELCAMBE, 1967;
Frequentin	P.frequentans P.palifans P.brefeldianum P.cyclopium	Farblose, nadelförmige Kristalle; Summenformel: C ₁₄ H ₂₀ O ₄ Löslich in Azeton, Dioxan, Alkohol, Chloroform und Benzol; Schmelzpunkt: 128°C Optische Aktivität: (α) _D ²⁴ = +82°;	Wirkt gegen Pilze; MHK-Wert: Botrytis allii 2,5 mcg/ml; Mucor mucedo 2,5 mcg/ml; A.niger und Absidia glauca 25-20 mcg/ ml; unwirksam gegen Bak- terien;	KORZYBSKI und KURYLOWICZ, 1961; BILAI, 1963; DELCAMBE, 1967; BRUNNER und MACHEK, 1970;

Substanz	Produzenten	Chem.-physikal. Daten	Biolog. Eigenschaften	Literatur
Frequentinsäure (= Citromycetin)	P. frequentans P. vesiculosum	Dunkelgelbe Kristalle; Summenformel: $C_{14}H_{10}O_7$ Löslich in Äthanol, Chloroform und Wasser; Schmelzpunkt: 155°C; optisch inaktiv;	Schwache antibiotische Aktivität; MHK-Wert: Micrococcus pyogenes var. aureus 125 mcg/ml; Salmonella enteritidis 2000 mcg/ml; Toxizität: gering; Maus zeigt toxische Erscheinungen bei 1200 mg/kg i.v. und 2500 mg/kg i.p.;	KORZYBSKI und KURYLOWICZ, 1961; BILAI, 1963; DELCAMBE, 1967; BRUNNER und MACHEK, 1970;
Fumagillin	A. fumigatus	Farblose Kristalle; Summenformel: $C_{26}H_{34}O_7$ In den meisten organ. Lösungsmitteln löslich; Schmelzpunkt: 191-193°C Optische Aktivität: $(\alpha)_D^{25} = -24^\circ$ (Chloroform) UV-Absorptionsspektrum: Maxima bei 239, 304, 322, 336 und 351 nm;	Gegen Pilze und Bakterien nur geringe antibiotische Aktivität; hemmt die Entwicklung von Bakteriophagen innerhalb der Zelle von Micrococcus pyogenes var. aureus 209; wirkt gegen Amoeben: 0,01 mcg/ml töten Entamoeba histolytica; Toxizität: LD ₅₀ Maus: 800 mg/kg s.c. 2000 mg/kg oral;	KORZYBSKI und KURYLOWICZ, 1961; BILAI, 1963; DELCAMBE, 1967; BRUNNER und MACHEK, 1970;
Fumigatin	A. fumigatus P. spinulosum	Braune Kristalle; Summenformel: $C_{28}H_{38}O_4$ Löslich in Azeton, Chloroform, Benzol, Äthanol, Äthylacetat u. Wasser; Schmelzpunkt: 116°C;	Wirkt gegen gram- und gram- Keime bei Konzentrationen zwischen 5-800 mcg/ml; in alkalischen Lösungen rasche Inaktivierung;	KORZYBSKI und KURYLOWICZ, 1961; BILAI, 1963; DELCAMBE, 1967;

Substanz	Produzenten	Chem.-physikal. Daten	Biolog. Eigenschaften	Literatur
Gentisylalkohol	P.patulum P.divergens P.urticae P.claviforme	Farblose Substanz; Summenformel: $C_7H_8O_3$ Löslich in Wasser, Äther Äthanol und Chloroform; Schmelzpunkt: 100-101°C;	Geringe antibiotische Aktivität; MHK-Wert: Micrococcus pyogenes var. aureus 2000 mcg/ml; Wirkung ist abhängig vom pH; Optimum bei 7,0;	KORZYBSKI und KURYLOWICZ, 1961; BILAI, 1963; DELCAMBE, 1968;
Geodin (= Estin)	A.terreus P.estinogenum P.paxilli var. echinulatum	Hellgelbe Substanz; Summenformel: $C_{17}H_{12}O_7Cl_2$ Löslich in Chloroform, Azeton und Dioxan; Schmelzpunkt: 235°C; optische Aktivität: (α) ₂₀ ^D 5461 = +179° (Chloroform);	Wirkt vor allem gegen gram+ Keime; MHK-Wert: Micrococcus pyogenes var. aureus 0,5-15 mcg/ml; E.coli 50 mcg/ml; Shigella dysenteriae 1000 mcg/ml.	KORZYBSKI und KURYLOWICZ, 1961; DELCAMBE, 1968; BRUNNER und MACHEK, 1970;
Gladiolsäure	P.gladioli	Farblose, nadelförmige Kristalle; Summenformel: $C_{11}H_{10}O_5$ Löslich in Wasser und Äther; optisch inaktiv; UV-Absorptionsspektrum: Maxima bei 275 und 343 nm (Natronlauge)	Gram+ und gram- Keime werden von Konzentrationen zwischen 260-500 mcg/ml gehemmt. Gute Wirksamkeit gegen Pilze; MHK-Wert: Botrytis allii 2 mcg/ml; Fusarien- u. Penicillienarten werden von Konzentrationen zwischen 1,9 und 15,6 mcg/ml gehemmt.	KORZYBSKI und KURYLOWICZ, 1961; BILAI, 1963; DELCAMBE, 1968; BRUNNER und MACHEK, 1970;
Glilotoxin	P.fenseni P.obscurum A.fumigatus	Farblose, nadelförmige bzw. plättchenförmige Kristalle;	Wirkt gegen viele Bakterien und Pilze.	BRUNNER und MACHEK, 1970

Substanz	Produzenten	Chem.-physikal. Daten	Biolog. Eigenschaften	Literatur
(Gliotoxin)		Summenformel: $C_{13}H_{14}O_4N_2S_2$ Löslich in Pyridin, Dioxan, Azeton und Chloroform; Schmelzpunkt: 195°C; optische Aktivität: $(\alpha)_D^{20} = -290^\circ$ (Äthanol); UV-Absorptionsspektrum: Maxima bei 270 und 450 nm.	<i>Micrococcus pyogenes</i> <i>var. aureus</i> 0,5-5,0 mcg/ml; Toxizität: Mengen von 45-65 mg/kg verursachen parenteral, subcutan oder oral verabreicht den Tod von Mäusen.	
Griseofulvin	<i>P. brefieldianum</i> <i>P. albidum</i> <i>P. brunneo-</i> <i>-stoloniferum</i> <i>P. griseofulvum</i> <i>P. janczewskii</i> <i>P. janthinellum</i> <i>P. melenii</i> <i>P. patulum</i> <i>P. raistrickii</i> <i>P. raciborski</i> <i>P. sclerotigenum</i> <i>P. urticae</i> <i>P. viridiciclopium</i>	Farblose rhombische bzw. oktaederförmige Kristalle; Summenformel: $C_{17}H_{17}O_6Cl$ Löslich in Essigsäure, Dioxan, Benzol, Methanol, Äthylacetat und Azeton; Schmelzpunkt: 218-221°C; optische Aktivität: $(\alpha)_D^{19} 5790 = +354^\circ$ UV-Absorptionsspektrum: Maxima bei 236, 291 und 324 nm.	Gegen verschiedene Pilze wirksam, nicht aber gegen Bakterien; dabei kommt es zu morphologischen Veränderungen der Pilze wie übermäßig vermehrte und atypische Verzweigungen (curling factor). MHK-Wert: <i>Botrytis allii</i> 0,2 mcg/ml; <i>Microsporium</i>, <i>Trichophyton</i> u. <i>Epidermophyton</i>arten werden von Konzentrationen zwischen 0,18-0,42 mcg/ml gehemmt. Toxizität: Hepatotoxisch und carcinogen für Versuchstiere; LD₅₀Ratte: 400 mg/kg.	KORZYBSKI und KURYLWICZ, 1967; BILAL, 1963; DELCAMBE, 1968; WILSON, 1971a;

Fortsetzung Tabelle 3

Substanz	Produzenten	Chem.-physikal. Daten	Biolog. Eigenschaften	Literatur
Helenin	<i>P.funiculosum</i>	Ribonucleoproteid; sehr instabil; UV-Absorptionsspektrum: Maximum bei 260 nm.	Soll gegen Viren wirksam sein; geringe Toxizität.	BRUNNER und MACHEK, 1970;
Helvolsäure (= Fumigacin)	<i>A.fumigatus</i>	Farblose, nadelförmige Kristalle; Summenformel: $C_{32}H_{42}O_8$ Löslich in Chloroform, Azeton, Essigsäure, Dioxan und Pyridin; Schmelzpunkt: 212°C; optische Aktivität: $(\alpha)_{D}^{23} = -113^{\circ}$ (Chloroform) UV-Absorptionsspektrum: Maxima bei 231 und 322 nm.	Wirkt vor allem gegen gram+ Keime; keine Wirkung gegen Pilze; MHK-Werte: <i>Micrococcus pyogenes</i> var. <i>aureus</i> 0,5-12,0 mcg/ml; <i>Salmonella typhi</i> 2000 mcg/ml Toxizität: LD ₅₀ Maus: 400 mg/kg i.p.	KORZYBSKI und KURYLOWICZ, 1961; BILAI, 1963; DELCAMBE, 1967; MACHEK, 1970;
Herquein	<i>P.herquesi</i>	Gelb-braune Kristalle; Summenformel: $C_{19}H_{20}O_8$ Löslich in Alkohol und Chloroform	MHK-Wert: <i>Vibrio coma</i> und <i>Micrococcus pyogenes</i> var. <i>aureus</i> 400 mcg/ml.	BURTON, 1949; KURYLOWICZ, 1961; BRUNNER und MACHEK, 1970;
Humicolin	<i>A.humicola</i>	Gelbes, schwach saures Öl; beständig bei pH 3,5-4,5; löslich in Petroläther.	Wirkt gegen Pilze; MHK-Wert: <i>Botrytis allii</i> 1 mcg/ml; <i>A.niger</i> , <i>A.terreus</i> , <i>F.coeruleum</i> , <i>Mucor mucedo</i> und <i>P.expansum</i> werden bei Konzentrationen zwischen 0,8-6,2 mcg/ml gehemmt.	BRUNNER und MACHEK, 1970;

Substanz	Produzenten	Chem.-physikal. Daten	Biolog. Eigenschaften	Literatur
Hydroxyaspergillusgillsäure	A. flavus	Farblose, nadelförmige Kristalle; Summenformel: $C_{12}H_{20}O_3N_2$ Löslich in Chloroform, Azeton, Methanol und Äthanol; Schmelzpunkt: 148-150°C; optische Aktivität: $(\alpha)_D^{25} = +36^\circ$ (Äthanol); UV-Absorptionsspektrum: Maxima bei 235 u. 328 nm.	Wirksam gegen gram ⁺ , gram negative und säurefeste Keime; MHK-Werte: Micrococcus pyogenes var. aureus 100 mcg/ml; Mycobacterium BCG 8 mcg/ml; E. coli 250 mcg/ml.	KORZYBSKI und KURYLOWICZ, 1961;
Janthinellin	P. janthinellum	Weißes, amorphes Pulver mit amphotären Eigenschaften; löslich in Alkoholen, Pyridin und Essigsäure; Schmelzpunkt: 98°C.	Wirkt gegen verschiedene Pilze ähnlich dem Griseofulvin.	BRUNNER und MACHEK, 1970;
Kojisäure	A. albus A. alliaceus A. awamori A. clavatus A. candidus A. effusus A. flavus A. fumigatus A. giganteus A. glaucus A. gymnosardae A. lutescens A. luteo-virescens A. oryzae A. nidulans	Farblose Kristalle; Summenformel: $C_6H_6O_4$ Löslich in Wasser, Äthanol und Äther; Schmelzpunkt: 152°C; Optisch inaktiv.	Hemmt das Wachstum bei folgenden Verdünnungsstufen: Bacillus megatherium 1:1000; B. subtilis 1:500; E. coli 1:2000; Leptospira canicola 1:100000; Staphylococcus aureus 1:500. Toxizität: LD ₅₀ Maus: ca. 30 mg/17g Maus i.p.; ab 250 mg/kg toxische Erscheinungen.	MORTON et al., 1945; GILL-CAREY, 1949a; KORZYBSKI und KURYLOWICZ, 1961; BILAL, 1963; BRUNNER und MACHEK, 1970;

Fortsetzung Tabelle 3

Substanz	Produzenten	Chem.-physikal. Daten	Biolog. Eigenschaften	Literatur
(Kojisäure)	A.parasiticus A.tamaritii A.wentii P.daleae P.kojigenum P.planosum			
Luteoskyrin	P.islandicum	Gelbe Kristalle; $C_{30}H_{42}O_{12}$ Summenformel: $C_{30}H_{42}O_{12}$ Löslich in Chloroform und Azeton; Schmelzpunkt: 287°C Molekulargewicht: 574 Optische Aktivität: $(\alpha)_D^{25} = -880^\circ$ (Azeton); UV-Absorptionsspektrum: Maxima bei 245, 275 und 430 nm; zerfällt bei Sonnenlicht.	Antibiotische Aktivität: ID ₅₀ Bacillus subtilis 0,18 mcg/ml; Staphylococcus aureus 0,22-0,55 mcg/ml; E.coli 0,4 mcg/ml; Toxizität: hepatotoxisch; chronisch: carcinogen; LD ₅₀ Maus: 221 mg/kg oral; 147 mg/kg s.c.; 40,8 mg/kg i.p.; 6,65 mg/kg i.v.	SAITO, ENOMOTO, TATSUNO, 1971; ENOMOTO und UENO, 1974;
Mellein (= Ochracin)	A.melleus A.ochraceus	Farblose, nadelförmige Kristalle; Summenformel: $C_{10}H_{10}O_3$ Schmelzpunkt: 58°C Optische Aktivität: $(\alpha)_D^{12} = -108^\circ$ UV-Absorptionsspektrum: Maxima bei 212, 246 und 314 nm.	Schwach wirksam gegen einige gram+ und gram- Keime, sowie gegen Mycobacterium phlei.	KORZYBSKI und KURYLOWICZ, 1961; BILAI, 1963; BRUNNER und MACHEK, 1970;

Fortsetzung Tabelle 3

Substanz	Produzenten	Chem.-physikal. Daten	Biolog. Eigenschaften	Literatur
Mycelianamid	P. griseofulvum	Farblose, plättchenförmige Kristalle; Summenformel: $C_{22}H_{28}O_5N_2$ Löslich in Azeton, Dioxan und Natriumcarbonat; Schmelzpunkt: 170-172°C; Optische Aktivität: (α) _D ¹⁹ ₅₄₆₁ = -217°; zerfällt leicht bei Einwirkung von Säuren und Alkalien.	MHK-Wert: Micrococcus pyogenes var. aureus 20-50 mcg/ml; Streptococcus pyogenes 20-50 mcg/ml; Bacillus anthracis 20-50 mcg/ml.	KORZYBSKI und KURYLOWICZ, 1961; BILAI, 1963; DELCAMBE, 1968
Mycophenolsäure	P. brevicompactum P. glaucum P. griseo-brunneum P. hageni P. patris mei P. scabrum P. stoloniferum P. szaferei P. viridicatum	Farblose, nadelförmige Kristalle; Summenformel: $C_{17}H_{20}O_6$ Löslich in heißem Wasser, Äthanol, Äther, Chloroform und Benzol; Schmelzpunkt: 141°C; optisch inaktiv.	Wirkt nur schwach gegen Bakterien, stark gegen Dermatophyten; MHK-Werte: Microsporum equium 50 mcg/ml; Trichophyton tonsurans 12 mcg/ml; Epidermophyton cruris 12 mcg/ml. Hemmt auch das Wachstum einiger Aspergillen und Penicillien. Toxizität: schädigt das blutbildende System; LD ₅₀ Maus: 2500 mg/kg oral; 550 mg/kg i.v..	BURTON, 1949; KORZYBSKI und KURYLOWICZ, 1961; BILAI, 1963; DELCAMBE, 1968 CIEGLER, DETROY und LILLEHOJ, 1971;
Neohydroxyaspergill-säure	A. sclerotiorum	Farblose, plättchenförmige Kristalle; Summenformel: $C_{12}H_{20}O_3N_2$	Wirksam gegen Phagen; schwach wirksam gegen Bakterien und Pilze;	KORZYBSKI und KURYLOWICZ, 1961;

Substanz	Produzenten	Chem.-physikal. Daten	Biolog. Eigenschaften	Literatur
(Neohydroxy- aspergillensäure)		Schmelzpunkt: 164-166°C; Optische Aktivität: (α) _D ²⁵ = -55,7 (Äthanol); UV-Absorptionsspektrum: Maxima bei 236 und 328 nm (Äthanollösung).	MHK-Werte: Micrococcus pyogenes var. aureus 250 mcg/ml; E.coli ATCC 9673 125 mcg/ml; Trichophyton mentagrophytes 175 mcg/ml.	DELCAMBE, 1968; BRUNNER und MACHEK, 1970;
Nidulin	A.nidulans	Farblose, rhombische Kristalle; Summenformel: C ₂₀ H ₁₇ O ₅ Cl ₃ Löslich in Natriumcarbo- nat; Schmelzpunkt: 180°C; optisch inaktiv; UV-Absorptionsspektrum: Maximum bei 267 nm.	MHK-Werte: Mycobacterium rauae 3 mcg/ml; Mycobac- terium tuberculosis 100- 200 mcg/ml.	KORZYBSKI und KURYLOWICZ, 1961; BILAI, 1963; BRUNNER und MACHEK, 1970;
Nor-Nidulin	A.nidulans A.austus	Hexagonale, plättchenför- mige Kristalle; Summen- formel: C ₁₉ H ₁₅ O ₅ Cl ₃ Schmelzpunkt: 185-187°C UV-Absorptionsspektrum: Maximum bei 266 nm.	MHK-Werte: Mycobacterium rauae 2 mcg/ml; Mycobac- terium tuberculosis 2-5 mcg/ml; Toxizität: 300-400 mg/kg ungereinigtes Präp. i.p. wird von Mäusen toleriert.	KORZYBSKI und KURYLOWICZ, 1961; BILAI, 1963; BRUNNER und MACHEK, 1970;
β -Nitropropa- nolsäure	A.flavus P.atrovenetum	Farblose Kristalle; Summenformel: C ₃ H ₅ O ₃ N Löslich in Wasser und org. Lösungsmitteln; Schmelzpunkt: 66-67°C; UV-Absorptionsspektrum: Maximum bei 273 nm.	Schwache antibiotische Aktivität gegen Mycobac- terium tuberculosis BCG; Toxizität: 110-200 mg/kg i.v. be- wirkt den Tod von Mäusen innerhalb 24 h.	WILSON, 1971 und 1971a;

Fortsetzung Tabelle 3

Substanz	Produzenten	Chem.-physikal. Daten	Biolog. Eigenschaften	Literatur
Ochratoxin A	A.alliaceus A.melleus A.ochraceus A.ostianus A.petrakii A.sclerotiorum A.sulfureus P.commune P.palians P.purpureus P.variabiles P.viridicatum	Farblose Kristalle; Summenformel: $C_{20}H_{18}ClNO_6$ Löslich in Azeton und Chloroform; Schmelzpunkt: 169°C; optische Aktivität: (α) _D = -118°; UV-Absorptionsspektrum: Maxima bei 213 und 331 nm.	Schwache antibiotische Aktivität gegenüber den meisten Bakterien; nur Bacillus cereus ist hoch empfindlich; im Plättchentest sind 1,5 mcg/Plättchen noch nachweisbar. Toxizität: Hepatotoxische und nephrotoxische Wirkung; LD ₅₀ Ratte: 20 mg/kg oral.	STEYN, 1971; HARWIG, 1974;
Palitanin	P.brefeldianum P.frequentans P.palians	Summenformel: $C_{14}H_{22}O_4$ Löslich in Alkohol, Chloroform und Äther; Schmelzpunkt: 163°C; optische Aktivität: (α) _D ²³ = +4,4° (Chloroform).	Besitzt ähnlich antifungale Eigenschaften wie Frequentin.	KORZYBSKI und KURYLOWICZ, 1961; BILAI, 1963; DELCAMBE, 1968; BRUNNER und MACHEK, 1970;
Patulin	A.clavatus A.giganteus A.terreus P.claviforme P.equinum P.expansum P.divergens P.leucopus P.melinii P.patulum P.novaezealandiae P.purtique	Farblose, rhombische, plättchenförmige Kristalle; Summenformel: $C_7H_6O_4$ Löslich in Wasser, Alkohol, Azeton u. Chloroform Schmelzpunkt: 110-112°C; optisch inaktiv; UV-Absorptionsspektrum: Maximum bei 276 nm.	Wirkt gegen gram- und gram-Keime; gegen Pilze wirkt es noch stärker; MHK-Werte: Micrococcus pyogenes var. aureus 6 mcg/ml; E.coli 12 mcg/ml; Pythium ultimum 1,2 mcg/ml; Toxizität: LD ₅₀ Maus: 35 mg/kg oral; 10-15 mg/kg s.c.	KENT und HEATLEY, 1945; BURTON, 1949; KORZYBSKI und KURYLOWICZ, 1961; BILAI, 1963; DELCAMBE, 1968; BRUNNER und MACHEK, 1970;

Substanz	Produzenten	Chem.-physikal. Daten	Biolog. Eigenschaften	Literatur
Penicilline	<i>P. notatum</i> <i>P. chrysogenum</i> <i>P. cinerascens</i> <i>P. turbatum</i> <i>P. brunneorubrum</i> <i>P. avellaneum</i> <i>P. chlorophaeum</i> <i>P. citreoroseum</i> <i>P. meleagridinum</i> <i>P. asperium</i> <i>P. lanosum</i> <i>P. rabeoborskii</i> <i>P. roseo-citreum</i> <i>P. griseofulvum</i> <i>P. crateriforme</i> <i>P. englandum</i> <i>P. humuli</i> <i>A. giganteus</i> <i>A. nidulans</i> <i>A. flavipes</i> <i>A. niger</i> <i>A. flavus</i> <i>A. oryzae</i> <i>A. parasiticus</i>	Penicillin G: Summenformel: $C_{16}H_{18}O_4N_2S$ Schmelzpunkt des Triäthylammoniumsalzes: 135-145°C; optische Aktivität: $(\alpha)_D = +304,7^\circ$ (Na-Salz) UV-Absorptionsspektrum: Maximum bei 2600 Å. Penicillin F: Summenformel: $C_{14}H_{20}O_4N_2S$ Schmelzpunkt des Triäthylammoniumsalzes: 90-110°C; optische Aktivität: $(\alpha)_D = +200^\circ$ Penicillin X: Summenformel: $C_{16}H_{18}O_4N_2S$ Schmelzpunkt des Triäthylammoniumsalzes: 126-136°C; UV-Absorptionsspektrum: Maximum bei 2800 Å. Amylpenicillin: Summenformel: $C_{14}H_{22}O_4N_2S$ Optische Aktivität: $(\alpha)_D = +306^\circ$ (Na-Salz).	Vor allem gegen gram+ Keine stark wirksames Antibiotikum; MKH-Werte für Penicillin G Natriumsalz: <i>Bacillus subtilis</i> 0,03-0,06 IE/ml; <i>Clostridium perfringens</i> 0,27 IE/ml; <i>Clostridium tetani</i> 0,02 IE/ml; <i>E. coli</i> über 20 IE/ml; <i>Mycobacterium phlei</i> 24-48 IE/ml; <i>Salmonella enteritidis</i> 84 IE/ml; <i>Salmonella schottmülleri</i> 1000 IE/ml; <i>Shigella dysenteriae</i> 840 IE/ml; <i>Micrococcus pyogenes</i> var. <i>aureus</i> 0,0042-17 IE/ml; <i>Micrococcus pyogenes</i> var. <i>albus</i> 0,027 IE/ml; <i>Streptococcus faecalis</i> 4,2 IE/ml; <i>Streptococcus pyogenes</i> 0,004-0,125 IE/ml; <i>Streptococcus viridans</i> 0,03-5 IE/ml.	KORZYBSKI und KURYLOWICZ, 1961;

Substanz	Produzenten	Chem.-physikal. Daten	Biolog. Eigenschaften	Literatur
(Penicilline)		Penicillin K: Summenformel: $C_{16}H_{26}O_4N_2S$ Schmelzpunkt des Tri- äthylammoniumsalzes: 110-113°C; optische Aktivität: (α)_D = +279° (Na-Salz).		
Penicillin- säure (Penicill- säure)	A.melleus A.ochraceus A.querцинus A.sulfureus P.baarnense P.cyclopium P.martensii P.mavoleus P.puberulum P.sulfureus P.thomii P.madriti P.stoloniferum P.suavoleus	Farblose, nadelförmige Kristalle; Summenformel: $C_8H_{10}O_4$ Löslich in heißem Wasser, Alkohol, Äther und Chloro- form; Schmelzpunkt: 83-84°C (Monohydrat: 58-64°); UV-Absorptionsspektrum: Maximum bei 220 nm.	Wirkt gegen gram- Keime etwas stärker als gegen gram⁺. MHK-Werte: E.coli 2 mcg/ml; Salmonella en- teritidis 30 mcg/ml; Micrococcus pyogenes var. aureus über 20-50 mcg/ml; Streptococcus mitis über 80 mcg/ml; Toxizität: Carcinogen: 1,0 mg 2mal wöchentlich verabreicht erzeugten transplantable Tumore nach 64 Wochen. LD₅₀ Maus: 600 mg/kg oral 250 mg/kg i.v. 110 mg/kg s.c.	BURTON, 1949; GILL-CAREY, 1949a; KORZYBSKI und KURYLOWICZ, 1961; CIEGLER, DETROY und LILLEHOJ, 1971;

Substanz	Produzenten	Chem. physikal. Daten	Biolog. Eigenschaften	Literatur
Penitrem A (=Tremorgenes- diuretisches Toxin)	P.cyclopium	Farblose Kristalle; Summenformel: $C_{37}H_{44}O_{16}NCl$ Löslich in polaren org. Lösungsmitteln; bei 180- 200°C zerfallen die Kristalle ohne zu schmelzen; UV-Absorptionsspektrum: Maxima bei 233 und 295 nm.	Keine antibiotischen Eigenschaften; Toxizität: Neurotoxische und nephrotoxische Aktivitäten; LD ₅₀ Maus: größer als 10 mg/kg oral oder i.p. 0,25 mg/kg bewirkt Zittern, 2,5 mg/kg erzeugt klonisch-tonische Krämpfe.	WILSON, 1971a; PURCHASE, 1974;
Phenicin (= Phoenicin)	P.phoeniceum P.rubrum	Gelbbraune, plättchenförmige Kristalle; Summenformel: $C_{14}H_{10}O_6$ Löslich in Chloroform, Essigsäure, heißem Äthanol und Wasser; Schmelzpunkt: 229-230°C.	Geringe antibiotische Aktivität: 1000 mcg/ml hemmen das Wachstum von Micrococcus pyogenes var. aureus.	BURTON, 1949; KORZYBSKI und KURYLOWICZ, 1961; BILAI, 1963; BRUNNER und MACHEK, 1970;
Puberulsäure	P.puberulum P.aurantiovirens P.cyclopium- viridicatum	Cremefarbenes, kristallines Pulver; Summenformel: $C_8H_6O_6$ Schmelzpunkt: 316-320°C; UV-Absorptionsspektrum: Maxima bei 270 und 350 nm.	MHK-Werte: Bacillus anthracis 30-60 mcg/ml; Micrococcus pyogenes var. aureus 17-170 mcg/ml; E.coli über 170 mcg/ml.	KORZYBSKI und KURYLOWICZ, 1961; BILAI, 1963; DELCAMBE, 1968;
Puberulonsäure	P.puberulum P.aurantiovirens P.cyclopium P.johannioli	Gelbe, plättchenförmige Kristalle; Summenformel: $C_9H_4O_7$ Schmelzpunkt: 296-298°C; UV-Absorptionsspektrum: Maxima bei 275 u. 317 nm.	Hat eine etwas geringere antibiotische Aktivität als Puberulsäure.	KORZYBSKI und KURYLOWICZ, 1961; BILAI, 1963; DELCAMBE, 1968;

Substanz	Produzenten	Chem.-physikal. Daten	Biolog. Eigenschaften	Literatur
Pulvillorinsäure	P. pulvillorum	Dunkelgelbe, nadelförmige Kristalle; löslich in Methanol, Äthanol, Butanol, Azeton, Äther und Dioxan; stabil zwischen pH 3 und 8 (25°C).	Hemmt zahlreiche Pilze in Konzentrationen von 3-25 mcg/ml.	KORZYBSKI und KURYLOWICZ, 1961; BILAI, 1963; DELCAMBE, 1968;
Quadrilineatin	A. quadrilineatus	Farblose, nadelförmige Kristalle; Summenformel: $C_{10}H_{10}O_4$ Löslich in Äther; Schmelzpunkt: 172°C; UV-Absorptionsspektrum: Maxima bei 250 und 297-300 nm.	Schwach wirksam gegen Bakterien; stärker gegen Pilze: 40 mcg/ml hemmen das Wachstum von Botrytis allii-Sporen.	KORZYBSKI und KURYLOWICZ, 1961; BRUNNER und MACHEK, 1970;
Rubratoxine	P. purpurogenum P. rubrum	Rubratoxin A: Summenformel: $C_{26}H_{32}O_{11}$ Schmelzpunkt: 210-214°C; Optische Aktivität: $(\alpha)_D^{20} = +84^\circ$ UV-Absorptionsspektrum: Maximum bei 252 nm. Rubratoxin B: Summenformel: $C_{26}H_{30}O_{11}$ Schmelzpunkt: 168-169°C; Optische Aktivität: $(\alpha)_D^{20} = +67^\circ$ UV-Absorptionsspektrum: Maximum bei 251 nm.	Äußerst geringe antibiotische Aktivität: Hochempfindliche Stämme von Bacillus, Micrococcus und Staphylococcus werden nur durch Konzentrationen von 1000 mcg/ml gehemmt. Toxizität: Hepatotoxisch; LD ₅₀ Maus: Rubratoxin A: 6,6 mg/kg Rubratoxin B: 3,0 mg/kg i.p. (gelöst in Propylenlycol) Potenziert die Wirkung von Aflatoxinen.	MOSS, 1971; NEWBERNE, 1974;

Substanz	Produzenten	Chem.-physikal. Daten	Biolog. Eigenschaften	Literatur
Rugulosin	P. brunneum P. rugulosum P. tardum P. variabile P. wortmanni	Dunkelgelbe, würfelförmige Kristalle; Summenformel: $C_{30}H_{22}O_{10}$ Löslich in Azeton, Dioxan, Pyridin, Äthylacetat und Eisessig; Schmelzpunkt: 290-293°C; optische Aktivität: (α) _D ²⁵ = +492° (Dioxan).	Wirkt vor allem gegen gram+ Keime; MHK-Werte: Streptococcus pyogenes 0,25 mcg/ml; Bacillus anthracis 0,50 mcg/ml; Toxizität: Hepatotoxisch: akut zentralobuläre Nekrose; chronisch: Hepatome; LD ₅₀ Maus: 55 mg/kg i.p. (Lösungsmittel: Olivenöl).	KORZYBSKI und KURYLOWICZ, 1961; DELCAMBE, 1969; BRUNNER und MACHEK, 1970; MOSS, 1971; PURCHASE, 1974;
Spinulosin	A. fumigatus P. cinareus P. spinulosum	Schwarze, plättchenförmige Kristalle; Summenformel: $C_8H_8O_5$ Löslich in Wasser und Äther; Schmelzpunkt: 202°C; optisch inaktiv.	Schwache antibiotische Aktivität; MHK-Werte: Micrococcus pyogenes var. aureus 67-170 mcg/ml; E. coli 100-250 mcg/ml; Mycobacterium smegmatis 500 mcg/ml.	KORZYBSKI und KURYLOWICZ, 1961; DELCAMBE, 1969; BRUNNER und MACHEK, 1970;
Sterigmato-cystin	A. flavus A. nidulans A. regulosus P. luteum	Summenformel: $C_{18}H_{12}O_6$ Löslich in Chloroform; Schmelzpunkt: 248°C; optische Aktivität: (α) _A ²⁰ = -398° (Chloroform)	Keine antibiotische Aktivität konnte beim Plättchentest nachgewiesen werden (100 mcg/Plättchen). Toxizität: Hepatotoxisch und nephrotoxisch; carcinogen bei Versuchstieren; LD ₅₀ Maus: im Extremfall bis 800 mg/kg oral; Ratte: 60 mg/kg i.p.	LILLEHOJ, 1968; DETROY, LILLEHOJ, CIEGLER, 1971; ENOMOTO und UENO, 1974;

Fortsetzung Tabelle 3

Substanz	Produzenten	Chem.-physikal. Daten	Biolog. Eigenschaften	Literatur
Stiplatsäure	P.stiapiatum	Gelbe, nadelförmige Kristalle; Summenformel: $C_8H_6O_5$ Löslich in Äthanol; Schmelzpunkt: 302-304°C.	Hemmt das Auskeimen von <i>Polyporus annosus</i> Sporen bei einer Konzentration von 100 mcg/ml.	KORZYBSKI und KURYLOWICZ, 1961; BRUNNER und MACHEK, 1970;
Tardin	P.tardum	Hellgelbes Öl; Summenformel: $C_{11}H_{15}O_3$ Löslich in Azeton, Benzol, Äthanol und Äther; optische Aktivität: (α) _D ²⁰ = -11,4° (Äthanol); über pH 8,0 instabil.	Wirkt besonders gegen gram+ Keime; MHK-Wert: <i>Micrococcus pyogenes</i> var. <i>aureus</i> 8 mcg/ml; <i>E. coli</i> über 1000 mcg/ml. Toxizität: 500 mcg/ml töten Leukozyten binnen einer halben Stunde.	KORZYBSKI und KURYLOWICZ, 1961; BILAI, 1963; DELCAMBE, 1969;
Terrecin	A.terreus	Hellgelbe, prismische Kristalle; Löslich in Azeton, Benzol, Äther und Äthanol; Schmelzpunkt: 219-220°C.	MHK-Werte: <i>Clostridium tetani</i> 0,025-0,2 mcg/ml; <i>Bacillus anthracis</i> 1,0 mcg/ml; <i>Micrococcus pyogenes</i> 5 mcg/ml; Toxizität: gering; Maus verträgt 1000 mg/kg i.p.	BRUNNER und MACHEK, 1970;
Terreinsäure	A.terreus	Fahlgelbe, plättchenförmige Kristalle; Summenformel: $C_7H_6O_4$ Löslich in Äther, Benzol, Äthanol und Wasser Schmelzpunkt: 120°C; optische Aktivität: (α) _D ²² = -16,6° (Chloroform) UV-Absorptionsspektrum: Maxima bei 213 und 316 nm.	Wirkt gegen gram+ und gram- Keime; MHK-Werte: <i>Micrococcus pyogenes</i> var. <i>aureus</i> 25-100 mcg/ml; <i>E. coli</i> 50-100 mcg/ml; <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 100 mcg/ml; Toxizität: 17 mg/kg i.v. rufen bei Mäusen keine toxischen Erscheinungen hervor; 100 mg/kg i.v. Tod innerhalb 2h.	KORZYBSKI und KURYLOWICZ, 1961; BILAI, 1963; DELCAMBE, 1969; BRUNNER und MACHEK, 1970;

Substanz	Produzenten	Chem.-physikal. Daten	Biolog. Eigenschaften	Literatur
Trypacidin	A.fumigatus	Plättchenförmige Kristalle löslich in Azeton, Benzol, Butanol und Chloroform; Schmelzpunkt: 228-231°C; optische Aktivität: $(\alpha)_D^{20} = -103^\circ$ (Äthylacetat) UV-Absorptionsspektrum: Maximum bei 228 nm.	Wirksam gegen Trypanosoma cruzi, Toxoplasma gondii und Leptospiren; Toxizität: LD ₅₀ Maus: 400-500 mg/kg i.p.	BRUNNER und MACHEK, 1970;
Viridicatin	P.cyclopium P.viridicatum	Farblose, nadelförmige Kristalle; Summenformel: C ₁₅ H ₁₁ O ₂ N Löslich in kochender konzentrierter HCl, schlechter in kaltem Wasser.	Wirksam gegen säurefeste Bakterien; MHK-Wert: Mycobacterium tuberculosis 60-70 mcg/ml; unwirksam gegen E.coli, Bacillus subtilis und Staphylococcus aureus.	KORZYBSKI und KURYLOWICZ, 1961; BILAL, 1963; BRUNNER und MACHEK, 1970; WILSON, 1971a;
Wortmannin	P.wortmanni	Neutral reagierende Verbindung, die leicht bei pH Werten zwischen 3-8 zerfällt.	Streng spezifische Wirkung gegen gewisse Pilze wie z. B. Botrytis allii und Cladosporium herbarum.	BRUNNER und MACHEK, 1970;
Xanthocillin-X	A.chevalieri P.notatum	Gelbe Kristalle; Summenformel: C ₁₆ H ₁₂ O ₄ N Löslich in Alkohol und Äthyläther; verkohlt bei 200°C ohne zu schmelzen.	Wirkt gegen gram+ und gram-Bakterien; MHK-Werte: Bacillus subtilis 6,0 mcg/ml; Salmonella typhi 0,5 mcg/ml; E.coli 2,0 mcg/ml; Micrococcus sp. 2,5 mcg/ml; Toxizität: LD ₅₀ Maus: 40 mg/kg oral; 35 mg/kg i.p.	KORZYBSKI und KURYLOWICZ, 1961; WILSON, 1971a.

Manche dieser sekundären Metaboliten, wie die Penicilline und das Griseofulvin, finden zur Prophylaxe und Therapie von Infektionskrankheiten seit geraumer Zeit Verwendung und werden für diesen Zweck Futtermitteln beigemischt. Andere sekundäre Stoffwechselprodukte, die während der Lagerung von Futtermitteln oder ihrer Rohstoffkomponenten von Mikroorganismen gebildet werden, verändern diese so, daß es nach der Verfütterung an Tiere zu Leistungsdepressionen oder sogar zur Auslösung von Krankheiten kommen kann (GEDEK, 1974). Dabei kommt den Stoffwechselprodukten von Aspergillen, Penicillien, Fusarien und Claviceps spp. besondere Bedeutung zu, da Pilze dieser Gattungen am häufigsten in Getreide und Getreideprodukten vorgefunden werden (HESSELTINE, 1974). Mykotoxine von Pilzen der Gattungen Aspergillus und Penicillium, die in derartigen Futtermitteln bzw. Futtermittelgrundstoffen nachgewiesen werden konnten, gibt Tabelle 4 wieder.

Nach HESSELTINE (1974) muß mit weitaus mehr Mykotoxinen dieser Gattungen in Zerealien gerechnet werden, wie z.B. mit Citroviridin, Cyclopiaconsäure, Gliotoxin, Rubratoxin, Luteoskyrin, Islanditoxin, Oxalsäure und Tremorgene, jedoch fehlen, um diese in Futtermitteln nachzuweisen, noch die geeigneten analytischen Methoden.

Tabelle 4: Natürliches Vorkommen von Mykotoxinen der Gattungen Aspergillus und Penicillium in Getreide und Getreideprodukten (nach Angaben von HESSELTINE, 1974).

Mykotoxin	nachgewiesen in
Aflatoxine	Weizen, Mais, Hirse, Gerste, Reis, Futtermittel
Ochratoxine	Futtermittel, Gerste, Hafer, Weizen, Mais, Getreide
Citrinin	Weizen, Roggen, Gerste
Sterigmatocystin	Getreide
Patulin	Weizenstroh
Penicillinsäure	Mais
Kojisäure	Mais

2.3 Umsetzung von Antibiotika durch in Futtermitteln vorkommende Pilze

Über Mikroorganismen, die in der Lage sind, Antibiotika abzubauen oder Veränderungen an deren Molekülstruktur zu bewirken, wird in der Literatur häufig berichtet. In den meisten Fällen handelt es sich dabei um Bakterien, darunter auch um Streptomyceten, die durch Bildung spezieller Enzyme die antibiotischen Substanzen zerstören (ABRAHAM und CHAIN, 1940; IYER et al., 1954; ABD-EL-MALEK et al., 1961; KLEIN und PRAMER, 1961).

Die Antibiotika werden dabei enzymatisch gesteuerten Reaktionen wie Hydrolyse, Demethylation, Carboxymethylation, Hydroxymethylation, Oxydation, Hydroxylation, Sulfoxydation, Reduktion, Deamination, Isomerisation und Transglycosylation unterworfen, die in der Regel zu Produkten mit keiner oder geringerer antibiotischen Aktivität als die Ausgangssubstanz führen (SEBEK, 1974).

Von derartigen Untersuchungen mit Pilzen liegen bislang nur vereinzelt Berichte vor.

Die Verwertung von Antibiotika durch Hefen beschreiben GRAM (1956) und GEDEK (1968).

Nach GRAM (1956) ist *Candida albicans* in der Lage, Tetracyclin, Aureomycin und Terramycin als Stickstoffquelle zu nutzen. Wurde dagegen Penicillin oder Streptomycin als Stickstoffquelle angeboten, so konnte kein Wachstum dieser Hefe festgestellt werden. Keines der untersuchten Antibiotika konnte als Kohlenstoffquelle dienen.

GEDEK (1968) untersuchte ebenfalls die Antibiotikaverwertung durch Hefen und wies nach, daß Stämme von *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis* und *Pichia fermentans* Penicillin und Tetracyclinhydrochlorid als Stickstoffquelle nutzen konnten, während Stämme von *Candida pseudotropicalis* und *Saccharomyces fragilis* nur Penicillin verwerteten.

Von den Schimmelpilzen waren nach NISSEN (1954) nicht weiter identifizierte Stämme der Gattung *Penicillium* in der Lage, Penicillin, Chloromycetin und Terramycin als alleinige Kohlen-

stoffquelle zu nutzen. Fusarienstämme konnten nur Penicillin verwerten.

Die Fähigkeit, Tetracyclin, 5-Hydroxytetracyclin, 7-Chlor-tetracyclin, 7-Chlor-6-demethyltetracyclin, 2-Acetyl-2-decarboxyamido-5-tetracyclin und 12-Deoxytetracyclin abzubauen, besitzt nach MEYERS und SMITH (1962) *Xylaria digitata*; die dabei entstehenden Metaboliten weisen keine antibiotische Aktivität mehr auf.

Die enzymatische Umwandlung von Penicillinen in 6-Aminopenicillansäure ist von wirtschaftlicher Bedeutung, da diese als Ausgangsmaterial zur Herstellung neuer semisynthetischer Penicilline Verwendung findet. Dieses Enzym, das unterschiedlich als Penicillin-Acylase, -Amidase oder Acyltransferase bezeichnet wird, ist sowohl bei Bakterien als auch bei Pilzen weit verbreitet (COLE, 1966; VEZINA et al., 1968; SEBEK, 1971; SEBEK, 1974).

Antimycin A, ein Antibiotikum, das in der Fischwirtschaft Verwendung findet, wird von *A.ochraceus* abgebaut. Die dabei entstehenden Abbauprodukte weisen keine antibakterielle Aktivität mehr auf und zeigen gegen *Saccharomyces cerevisiae* Y-30 eine Hemmwirkung, die nur 2% der des Aktinomycins entspricht (LENNON und VEZINA, 1973).

Bleomycin B₂, eine Substanz, die einer Gruppe zytostatischer Glucopeptid-Antibiotika angehört, wird von *Fusarium anguioides* in Agmatin und Bleomycinsäure gespalten. Das gebildete Enzym war nur für die Aminogruppe dieses Antibiotikums spezifisch, da andere Bleomycine mit unterschiedlichen Aminen von diesem Enzym nicht angegriffen wurden (SEBEK, 1974).

Ascochitin, eine antibiotische Substanz mit toxischen Eigenschaften, die von *Ascochyta pisi* Lib. und *Ascochyta fabae* synthetisiert wird, wird von *Fusarium lycopersici* Sacc. reduziert und dadurch in das weniger toxische Dihydroascochitin umgewandelt (OKU und NAKANSHI, 1964).

Durch Deamination wird Formicin in Formicin B, Cordycepin in 3-Deoxyinosin und Blasticin S in Deaminohydroxyblasticin S umstrukturiert. Neben Streptomyceten sind Vertreter der Gattung *Aspergillus* (u.a. *A.niger* und *A.fumigatus*) zu diesen Antibiotikaumwandlungen fähig (SEBEK, 1974).

Das stark toxische Aflatoxin B₁ soll von verschiedenen Mikroorganismen abgebaut werden. Nach Untersuchungen von MANN und REHM (1975) sind dazu neben verschiedenen Bakterien und Hefearten auch Schimmelpilze fähig, u.a. *P.islandicum*, *P.citreoviride*, *P.chrysogenum*, *A.niger* und *A.ochraceus*. Bei genaueren Abbauuntersuchungen mit *A.niger* konnten sie feststellen, daß dabei Aflatoxin B₁ in Aflatoxin R₀ umgewandelt wird.

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1 Material und Methoden

3.1.1 Herkunft der Schimmelpilzstämmе

140 von 153 Schimmelpilzstämmen der Gattungen *Aspergillus* und *Penicillium* stammten aus Untersuchungsmaterial der Diagnostik des Instituts für Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin des Fachbereiches Tiermedizin der Ludwig-Maximilians-Universität. 12 Stämme wurden von der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Berlin und ein Stamm von der American Type Culture Collection, Rockville, Maryland U.S.A. bezogen.

Bei dem Untersuchungsmaterial der Diagnostik des Instituts handelte es sich hauptsächlich um Futtermittelproben unterschiedlicher Herkunft und Qualität. Nur 13 Stämme wurden aus anderem organischen Untersuchungsmaterial isoliert. Eine nähere Aufschlüsselung erfolgt in Tabelle 5.

Alle 153 Stämme wurden auf die Bildung von Stoffwechselprodukten mit antibiotischer Wirkung untersucht und von diesen 30 Stämme ausgewählt, um sie auch auf die Fähigkeit zum Abbau bekannter Antibiotika zu testen.

Tabelle 5: Angaben zur Art des Untersuchungsmaterials und der Zahl der daraus isolierten Schimmelpilzstämmе.

Untersuchungsmaterial	Anzahl der Proben	Zahl der Stämme
Mischfutter für Kälber	2	3
für Schweine	8	16
für Geflügel	16	25
für Labortiere	7	12
Mischfutter ohne Deklaration	11	15
Milchaustauscher	3	5
Einzelfuttermittel bzw. Rohstoff- komponenten:		
Mais	9	11
Gerste	1	1
Soja	3	3
Hafermehl	1	4
Getreideschrot	1	2
Weizenkleie	1	1
Tapioka	4	7
Johannisbrot	1	2
Kokosexpeller	1	2
Eiweißkonzentrat	3	4
Grassilage	5	7
Maissilage	3	4
Heu	3	3
 Futtermittel, allgemein	 83	 127
Sonstiges Untersuchungsmaterial (z.B. Sperma, Hautschuppen etc.)	13	13
 Insgesamt	 96	 140

3.1.2 Isolierung, Identifizierung und Aufbewahrung der Stämme

Die Isolierung der Stämme aus Untersuchungsmaterial der Diagnostik des Instituts erfolgte jeweils nach der Anzucht auf einem der bewährten Pilznährböden, Sabouraud-Dextrose-Agar (Merck Art. 7315) oder Czapek-Dox'-Agar (Oxoid CM 97), mit Zusatz von Penicillin und Streptomycin zur Unterdrückung des Bakterienwachstums.

Die Pilzgattung wurde mittels einer mikroskopischen Untersuchung der Fruktifikationsorgane bestimmt. Die genaue Identifizierung der Arten wurde für 92 Stämme im Centralbureau voor Schimmelcultures Baarn (Niederlande) vorgenommen. 46 Stämme wurden selbst auf Grund ihrer makroskopischen und mikroskopischen Morphologie und durch Vergleich mit schon identifizierten Stämmen bestimmt. Zwei Stämme der Gattung *Penicillium* konnten noch keiner Art zugeordnet werden. Die bestimmten Stämme gehörten 14 Arten der Gattung *Penicillium* und 12 Arten der Gattung *Aspergillus* an (vgl. Tabelle 6).

Die Aufbewahrung der Stämme erfolgte auf Sabouraud-Dextrose-Schrägagar (Merck Art. 7315). In Reagenzgläser (20 ml) wurden jeweils ca. 7 ml des im Dampftopf zur Lösung gebrachten Agars abgefüllt, mit einem Zellstoffstopfen verschlossen und nach Autoklavieren über 10 Minuten bis zum Erstarren des Agars in Schräglage verbracht. Mit einer ausgeglühten Öse wurde Kulturmateriel von Einzelkolonien auf dem Schrägagar ausgestrichen und dieser in der Regel 10 Tage bei Zimmertemperatur bebrütet. Nach reichlicher Ausbildung von fruktifizierendem Mycel wurde, um die Kulturen vor dem Austrocknen zu schützen, der Zellstoffstopfen in heißes Paraffin getaucht und die Reagenzgläser damit wieder verschlossen. Anschließend wurden die Stämme im Kühlschrank bei +4°C aufbewahrt und in halbjährlichem Abstand überimpft.

Tabelle 6: Systematische Zugehörigkeit der 153 Schimmelpilzstämmе

Gattungs- bzw. Artnamen	Anzahl der aus Untersu- chungsmaterial isolierten Stämme	Anzahl der von Labora- torien be- zogenen Stämme	Gesamt- zahl
<u>Aspergillus:</u>			
A.amstelodami THOM & CHURCH	2	0	2
A.candidus LINK	9	1	10
A.flavus LINK	3	1	4
A.fumigatus FRESENIUS	7	0	7
A.montevidensis TALICE & MACKINNON	1	0	1
A.nidulans EIDAM	4	0	4
A.ochraceus WILHELM	1	0	1
A.repens DE BARY	6	0	6
A.sydowi THOM & CHURCH	1	0	1
A.terreus THOM	3	1	4
A.ustus THOM & CHURCH	1	0	1
A.versicolor TIRABOSCHI	3	0	3
<u>Penicillium:</u>			
P.canescens SOPP	3	0	3
P.chrysogenum THOM	2	0	2
P.citrinum THOM	0	1	1
P.cyclopium WESTLING	62	1	63
P.expansum LINK	1	1	2
P.frequentans WESTLING	2	1	3
P.griseofulvum DIERCKX	1	0	1
P.islandicum SOPP	10	1	11
P.martensii BIOUSGE	1	0	1
P.notatum WESTLING	2	1	3
P.palitans WESTLING	1	0	1
P.patulum BAINIER	0	1	1
P.roqueforti THOM	8	0	8
P.thomii MAIRE	1	0	1
P.variabile SOPP	2	1	3
P.viridicatum WESTLING	1	2	3
P.spp.	2	0	2

3.1.3 Untersuchung der Stämme auf die Bildung von Stoffwechselprodukten mit antibiotischer Wirkung

3.1.3.1 Anreicherung der Stämme vor der Bestimmung der antibiotischen Aktivität ihrer Stoffwechselprodukte

Der Anreicherung von Schimmelpilzmetaboliten der zu prüfenden Stämme diene YES-Medium, welches sich schon bei Versuchen mit ähnlicher Fragestellung bewährte (DAVIS et al., 1966; VAN WALBEEK et al., 1968; SCOTT et al., 1972). Es handelt sich dabei um einen flüssigen Nährboden, der aus 2 g Yeast Extrakt (Difco Nr. 0127-02), 15 g Saccharose, reinst (Merck Art. 7653) und 100 ml Aqua dest. besteht. Von dem Nährmedium, das durch Filtration keimfrei gemacht worden war, wurden jeweils 5 ml in sterile, mit einem Zellstoffstopfen verschlossene Reagenzglaser pipettiert und mit 0,1 ml einer homogenen Schimmelpilzsporensuspension beimpft. Diese wurde durch Abschwemmen einer Schrägagarkultur mit 5 ml steriler physiologischer Kochsalzlösung erhalten. Jeder zu untersuchende Stamm wurde 3fach angesetzt. Kulturzeit und Temperatur wurden nach den hierfür von ORTH (1972) vorliegenden Angaben gewählt, und jeweils sieben Tage das beimpfte YES-Medium bei 32°C und weitere zehn Tage bei Zimmertemperatur (20°-24°C) bebrütet.

3.1.3.2 Bestimmung der antibiotischen Aktivität der Anreicherungsflüssigkeit unter Anwendung des Reihenverdünnungstestes

Die Bestimmung der antibiotischen Aktivität der Anreicherungsflüssigkeit erfolgte in Anlehnung an das Verfahren der Feststellung der minimalen Hemmstoffkonzentration (MHK) nach der hierfür von FRANK (1972) angegebenen Methodik und unter Verwendung von *Bacillus stearothermophilus* als Testkeim.

Mit einer ausgeglühten Öse wurde zuvor das auf der Oberfläche der Anreicherungsflüssigkeit gebildete Mycel entfernt und der pH-Wert der Anreicherungsflüssigkeit mit einer 1n Natronlauge (Merck Art. 9137) auf pH 6,0 eingestellt. 0,05 ml NaOH pro

Milliliter Anreicherungsflüssigkeit war die größte hierbei verwendete Menge.

Dies war notwendig, da, wie in einem Vorversuch festgestellt wurde, das Wachstum des Testkeimes *Bacillus stearothermophilus* durch pH-Werte kleiner als oder gleich 5,0 gehemmt wird. Dieses Verhalten des Testkeimes wird auch von YAZDANY et al. (1975) berichtet.

Ausgehend von 1 ml Anreicherungsflüssigkeit wurde jeweils eine Verdünnungsreihe mit dem Faktor 1:2 hergestellt, wobei die von FRANK (1972) beschriebene Nährlösung als Verdünnungsmedium diente. Sie setzt sich aus 10,0 g Pepton aus Fleisch (Merck Art. 7214), 5 g Glucose (Merck Art. 8342 E), 0,04 g Bromkresolpurpur (Oxoid CM 73), 0,001 g Brillantschwarz (Merck Art. 1921) und 1000 ml Aqua dest. zusammen und wurde durch Autoklavieren über 15 Minuten entkeimt. Jede Verdünnungsstufe wurde mit 1 ml *Bacillus stearothermophilus*-Keimsuspension (ca. 10^6 Keime/ml) beimpft. Der Testkeim wurde aus Sporentestreifen zur Sterilisatorkontrolle (Oxoid BR 23) isoliert. Ein Teststreifen wurde in 5 ml Standard-I-Bouillon (Merck Art. 7882) 24 Stunden bei 68°C bebrütet. Anschließend wurde diese Keimanreicherung mit steriler physiologischer Kochsalzlösung 1:10 verdünnt, so daß sich ein durchschnittlicher Keimgehalt von 10^6 Keimen/ml einstellte. Die beimpfte Verdünnungsreihe wurde 18 Stunden bei 68°C bebrütet. Als Auswertungskriterium diente die Farbe der Kulturflüssigkeit, die bei Fehlen von Stoffen mit antibiotischer Wirkung von purpur nach gelb umgeschlagen sein mußte.

Bei jedem Versuch liefen zwei Kontrollen mit; eine bestand aus 1 ml Nährlösung und 1 ml Keimsuspension und zeigte durch Farbumschlag das Wachstum der Keime an. Das zweite Kontrollröhrchen enthielt 0,5 ml Nährlösung und 0,5 ml Anreicherungsflüssigkeit, um chemische Reaktionen oder bakterielle Verunreinigungen, die von sich aus zu Farbveränderungen hätten führen können, zu erkennen. Durch Vergleich mit standardisiertem Penicillin G-Natrium (Hoechst 1666 IE/mg) konnte jeder Verdünnungsstufe eine gewisse Menge Penicillin zugeordnet werden, wodurch eine quantitative Angabe in Penicillinäquivalenten möglich wurde (vgl. Tabelle 9).

3.1.3.3 Prüfung der Pilzkulturen auf das Vorhandensein von Metaboliten mit antibiotischer Aktivität

3.1.3.3.1 Extraktion der Anreicherungen in YES-Medium

Dazu wurden die 17 Tage alten Anreicherungen der Schimmelpilze mit heißem Chloroform extrahiert (SCOTT, 1970). Der Inhalt eines Anreicherungsröhrchens (Mycel, Sporen + Flüssigkeit) wurde in einen 250 ml Erlenmeyerkolben übergeführt und das Mycel mit Hilfe eines abgeflammt Glasstabes zerrieben. Dann wurden 1 ml Methanol (Merck Art. 6012) und 24 ml Chloroform (Merck Art. 2445) hinzugefügt, 10 Minuten geschüttelt und dann weitere 10 Minuten im Wasserbad bei 60°C erhitzt. Der Erlenmeyerkolben war hierbei mit Alufolie verschlossen, um ein zu starkes Verdampfen des Chloroforms zu verhindern. Nach dem Erkalten wurde der Inhalt des Erlenmeyerkolbens in einen Scheidetrichter filtriert. Die Chloroformphase wurde in einem Glaskolben aufgefangen und mit Hilfe eines Rotationsverdampfers vollkommen eingengt. Der so gewonnene Extrakt wurde in 1 ml Chloroform aufgenommen. Extrakte von *P.islandicum*, die die Anwesenheit von Luteoskyrin vermuten ließen, wurden wegen dem Auftreten von Störsubstanzen vor der Dünnschichtchromatographie durch Säulenchromatographie aufgetrennt (nach LEISTNER, 1975). Die Chromatographiesäule (Pharmacia, SR 25/45) wurde 20 cm hoch mit über Nacht in Chloroform gequollenen Sephadex LH 20 (Pharmacia fine chemicals, Schweden) angefüllt. Der gesamte Extrakt wurde in 40 Fraktionen à 8,5 ml aufgeteilt, wobei die ersten 15 Fraktionen mit Chloroform, die restlichen 25 mit Azeton gewonnen wurden. Mit Hilfe eines Rotationsverdampfers wurden die Fraktionen vollständig eingengt und dünnschichtchromatographisch weiter untersucht.

3.1.3.3.2 Ermittlung der allgemeinen antibiotischen Aktivität des Extraktes unter Verwendung des Agardiffusions-testes

Der in 1 ml Chloroform aufgenommene Extrakt wurde zunächst auch allgemein auf antibiotische Aktivität untersucht, die

mit dem Agardiffusionstest bestimmt wurde. Als Testkeim diente wiederum *Bacillus stearothermophilus* (Oxoid BR 23). Die Oberfläche gleichdicker DST-Agarplatten (Nährboden der Fa. Oxoid, Code Nr. CM 261) wurden mit 0,5 ml Testkeimsuspension (ca. 10^6 Keime/ml) überschichtet und bei Zimmertemperatur getrocknet. Sterile, hemmstofffreie Testplättchen (Schleicher und Schüll Nr. 2668, Durchmesser 9 mm) wurden jeweils mit 45 mcl des Chloroformextraktes beschickt. Nachdem das Chloroform von den Testplättchen abgedampft war, wurden diese auf die inzwischen getrockneten DST-Platten gelegt. Nach einer Vordiffusionszeit von 30 Minuten bei Zimmertemperatur, wurden die Platten 18 Stunden bei 68°C bebrütet. Der Durchmesser des Hemmhofes diente als Maß für die antibiotische Aktivität des Extraktes. Mit standardisiertem Penicillin G-Natrium (Hoechst, 1666 IE/mg) wurde eine Eichkurve erstellt, die es möglich machte, die nachgewiesene Hemmwirkung in Penicillinäquivalent auszudrücken. Dazu wurde 1 mg Penicillin G-Natrium so in Chloroform gelöst (Lösungsvermittler Äthanol), daß sich Konzentrationen von 10 mcg/ml, 5 mcg/ml, 1 mcg/ml, 0,5 mcg/ml, 0,1 mcg/ml und 0,05 mcg/ml ergaben. Ebenfalls 45 mcl von diesen Verdünnungsstufen wurden auf die Testplättchen pipettiert und die dazu gehörigen Hemmhöfe nach dem oben beschriebenen Verfahren bestimmt.

3.1.3.3.3 Nachweis spezieller Mykotoxine mit antibiotischen Eigenschaften durch Dünnschichtchromatographie (DC)

Die in einem Milliliter Chloroform aufgenommenen Extrakte wurden zur Ermittlung des Vorhandenseins bekannter antibiotischer Substanzen mit toxischer Wirkung mittels Dünnschichtchromatographie (DC) aufgetrennt und auf die Mykotoxine Aflatoxin B₁, Aflatoxin G₁, Citrinin, Ochratoxin A, Sterigmatocystin, Penicillinsäure und Luteoskyrin untersucht. Als DC-Platten kamen DC-Fertigplatten (Kieselgel 60, Schichtdicke 0,25 mm) der Firma Merck mit (Art. 5715) und ohne (Art. 5721) Fluoreszenzindikator zur Verwendung. Von den Extrakten wurden jeweils 30 mcl und von den als Vergleichssubstanzen verwendeten Toxinstandards 10 mcl mit einer Finnpipette aufgetropft. Die Platten wurden

in den von SCOTT (1970) angegebenen Fließmitteln TEA (Toluol: Essigsäureäthylester:Ameisensäure, 120:60:20) und BME (Benzol:Methanol:Essigsäure, 178:14:8) eindimensional entwickelt (s. Abb. 4). Ausgewertet wurden sie bei Tageslicht und unter UV-Licht (254 und 350 nm). Laufhöhe (Rf) und Farbe der einzelnen Punkte vor und nach dem Einwirken von bestimmten Reagenzien im Vergleich zu den bekannten Standardtoxinen waren die entscheidenden Kriterien.

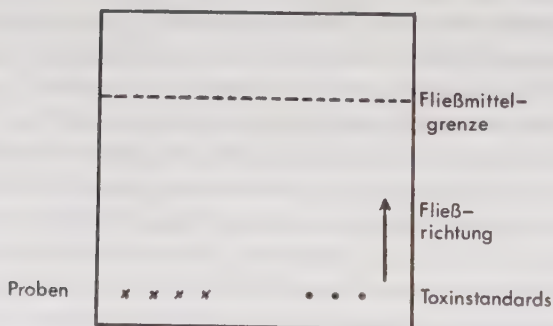


Abb. 4: Eindimensionale Dünnschichtchromatographie

Extrakte, die toxinhaltig zu sein schienen, wurden zweidimensional, mit und ohne "internem Standard" aufgetrennt. Bei der Anwendung des "internen Standards" wurde das vermutete Toxin mit dem Extrakt im Startpunkt aufgetropft und zweidimensional entwickelt (s. Abb. 5).

Sollte die fragliche Substanz mit dem Toxin identisch sein, so war die erste Voraussetzung, daß die beiden gleichfluoreszierenden Punkte deckungsgleich übereinander lagen. War dies der Fall, so wurden die Platten (mit und ohne internem Standard) mit den in der Literatur beschriebenen Reagenzien besprüht, 10-20 Minuten bei 120°C erhitzt und die Farbumschläge der sich

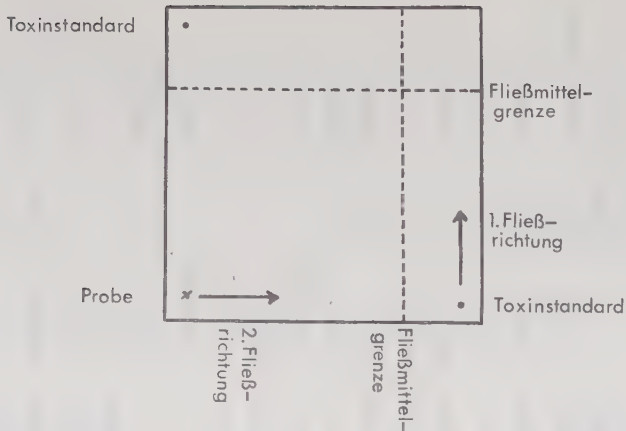


Abb. 5: Zweidimensionale Dünnschichtchromatographie

entsprechenden Punkte bei Tageslicht und UV-Licht beurteilt.
Die Reagenzien setzten sich wie folgt zusammen:

p-Anisaldehyd-Reagenz (SCOTT, 1970):

- 0,5 ml p-Anisaldehyd (Merck Art. 822314)
- 85 ml Methanol (Merck Art. 6012)
- 10 ml Eisessig (Merck Art. 61)
- 5 ml Schwefelsäure (konz.) (Merck Art. 731)

H₂SO₄-Reagenz (LEISTNER, 1974):

- 20% Schwefelsäure

AlCl₃-Reagenz (LEISTNER, 1974):

- 0,1 g Aluminiumchlorid (Merck Art. 1084)
- 8,0 ml Äthanol (Merck Art. 972)
- 2,0 ml Aqua dest.

Ehrlich's Reagenz (LEISTNER, 1974):

- 2,0 g 4-Dimethylaminobenzaldehyd (Merck Art. 3057)
- 20 ml konzentrierte Salzsäure (Merck Art. 316)
- 80 ml Äthanol (Merck Art. 972)

NH₃-Reagenz (LEISTNER, 1974):

- Einwirken von Ammoniakdämpfen; keine Erhitzung der Platten, (Ammoniaklösung, 25%ig, Merck Art. 5422)

Die Auswertung erfolgte nach den von SCOTT (1970) und LEISTNER (1974) erteilten Informationen zur Dünnschichtchromatographie von Mykotoxinen (vgl. Tabelle 7).

Tabelle 7: Dünnschichtchromatographie von Mykotoxinen: Nachweisgrenzen, Sprühreagenzien und Farbreaktionen (nach SCOTT et al., 1970 und LEISTNER, 1974)

	Nachweisgrenze			Rf		Farbe		Sprüh-	Autor	Farbe nach Besprühen Tages- UV-Licht
	SCOTT	LEISTNER	Fließmittel	TEA	BME	mcg	mcg/ml			
Aflatoxin B ₁	1	0,0003	0,23	0,31	-	blau	blau	p-Anis- aldehyd	SCOTT	pink
Aflatoxin G ₁	1		0,14	0,23	-	grün	grün	p-Anis- aldehyd	SCOTT	blau
Citrinin	10	0,01	0,0-	0,16-	-	gelb	gelb	p-Anis- aldehyd	SCOTT	gelb - grün
			0,20	0,48				H ₂ SO ₄	LEISTNER	blau
Ochratoxin A	10		0,35	0,55	-	grün	grün	p-Anis- aldehyd	SCOTT ,	blau
								NH ₃	LEISTNER	blau
Sterigmatocystin	50	0,01	0,75	0,85	-	rot-	braun	p-Anis- aldehyd	SCOTT	gelb
								AlCl ₃	LEISTNER	gelb
Penicillin-säure	200	0,6	0,22	0,47	-	-	-	p-Anis- aldehyd	SCOTT	grün
								NH ₃	LEISTNER	blau
Luteoskyrin	1000	1,0	0,0-	0,0-	gelb	gelb	gelb	p-Anis- aldehyd	SCOTT	orange
			0,23	0,47				Ehrlich	LEISTNER	braun

3.1.4 Untersuchung des Abbaues von Antibiotika durch Schimmelpilze

3.1.4.1 Kultivierung der Schimmelpilze und pH-Kontrolle

Die Untersuchung der 30 ausgewählten Schimmelpilzstämmen der Gattungen *Aspergillus* und *Penicillium* auf die Abbaufähigkeit von Antibiotika erfolgte unter Verwendung des flüssigen Minimalnährbodens Bacto Yeast Carbon-Base (Difco Nr. 0391-15), die aus folgenden Einzelkomponenten besteht:

<u>Spurenelemente</u>	<u>Mikrogramm</u>
H_3BO_3	500
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	40
KJ	100
$\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	200
$\text{MnSO}_4 \cdot 1 \text{H}_2\text{O}$	400
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	200
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	400
<u>Vitamine</u>	
Biotin	2
Calcium pantothenat	400
Folsäure	2
Inositol	2000
Paraaminobenzoessäure	200
Niacin	400
Pyridoxin hydrochlorid	400
Riboflavin	200
Thiamin hydrochlorid	400
<u>Aminosäuren</u>	<u>Milligramm</u>
L-Histidin monohydrochlorid $\cdot 1 \text{H}_2\text{O}$	1,00
DL-Methionin	2,00
DL-Tryptophan	2,00

<u>Salze</u>	<u>Gramm</u>
KH_2PO_4	1,00
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$	0,50
NaCl	0,10
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$	0,10
<u>Kohlenstoffquelle</u>	
Glucose	10,00
<u>Stickstoffquelle</u>	0,00
Aqua dest.	1000 ml

Dem Nährmedium fehlt fast gänzlich eine Stickstoffquelle, jedoch gelingt es den Pilzsporen auszukeimen und ein feines Mycel zu bilden. An Stelle einer sonst üblichen anorganischen Stickstoffquelle wurden die Antibiotika Tetracyclin Base (Serva, Nr. 35 865), Bacitracin (Serva, Nr. 14420, 60 000 IE/g) und Penicillin G-Natrium (Hoechst) dem Medium zugesetzt und zwar so, daß sich für Tetracyclin und Bacitracin eine Konzentration von 10 mcg/ml, für Penicillin 1,0 mcg/ml ergab. Durch Seitz-Filtration wurden die Nährmedien keimfrei gemacht. Es wurde dabei berücksichtigt, daß Antibiotika in wässrigen Lösungen oft gegen bestimmte pH-Werte empfindlich sind. So ist Penicillin in einem Bereich von pH 5,0 - 7,0 verhältnismäßig stabil, während es bei einem pH-Wert unter 4,5 rasch inaktiviert wird.

Umgekehrt verhält es sich mit Bacitracin und Tetracyclin. Diese sind in saueren pH-Bereichen relativ stabil, während sie in neutralen bzw. alkalischen Lösungen rasch ihre antibiotische Aktivität verlieren (WALTER und HEILMEYER, 1969). Um der Abhängigkeit der Wirkungsweise der Stoffe von Wasserstoffionenkonzentration gerecht zu werden, wurden die Versuche sowohl in gepuffertem als auch ungepuffertem Medium durchgeführt. Die Medien mit Bacitracin und Tetracyclin wurden bei pH 4,50, mit Penicillin bei 6,00 gepuffert. Verwendet wurde die Pufferlösung nach MC ILVAINE (WALLHÄUSER und SCHMIDT, 1967) mit folgender Zusammensetzung:

Puffer pH 4,50: 45,4 ml 0,2 molar Na_2HPO_4
54,6 ml 0,1 molare Zitronensäure

Puffer pH 6,00: 63,2 ml 0,2 molar Na_2HPO_4
36,8 ml 0,1 molare Zitronensäure

Da Schimmelpilze in der Lage sind, während eines Abbaues zugleich wieder antibiotische Substanzen aufzubauen, erwies es sich erforderlich, Kontrollen zum Vergleich mit Kaliumnitrat (10,0 mcg/ml) als Stickstoffquelle anzusetzen.

Jeder der insgesamt 30 Schimmelpilzstämmen wurde unter Verwendung folgender Nährmedien getestet:

Carbon-Base + Tetracyclin (10 mcg/ml) gepuffert pH 4,5
Carbon-Base + Bacitracin (10 mcg/ml) gepuffert pH 4,5
Carbon-Base + Penicillin (1,0 mcg/ml) gepuffert pH 6,0
Carbon-Base + KNO_3 (10 mcg/ml) gepuffert pH 6,0
Carbon-Base + KNO_3 (10 mcg/ml) gepuffert pH 4,5
Carbon-Base + Tetracyclin (10 mcg/ml) ungepuffert
Carbon-Base + Bacitracin (10 mcg/ml) ungepuffert
Carbon-Base + Penicillin (1 mcg/ml) ungepuffert
Carbon-Base + KNO_3 (10 mcg/ml) ungepuffert

Dazu wurde jeweils 20 ml dieser Nährmedien in sterile, mit einem Zellstoffstopfen verschlossene Erlenmeyerkolben (50 ml) pipettiert und mit 0,1 ml einer homogenen Sporensuspension (Konzentration 10^6 - 10^7 Sporen pro Milliliter) beimpft. Sie wurde durch Abschwemmen einer Schrägagarkultur mit 5 ml steriler physiologischer Kochsalzlösung hergestellt. Von jedem Medium blieben pro Versuchsreihe 20 ml als Kontrolle unbeimpft. Es wurden insgesamt 5 Versuchsreihen mit jeweils 6 Stämmen durchgeführt.

Am 0., 3., 7., 10., 14., 17., 21., 24. und 28. Tag der bei Zimmertemperatur bebrüteten Kulturen wurden jeweils 1,5 ml der Nährflüssigkeit abpipettiert, und zur gleichen Zeit wurde mit der Überprüfung der antibiotischen Aktivität mit dem unter 3.1.4.3 beschriebenen Agar-Loch-Diffusionstest der pH-Wert mit einem elektrischen pH-Meter kontrolliert.

3.1.4.2 Bestimmung der Hemmhofgrößen der als N-Quelle angebotenen Antibiotika

Da der Bestimmung der Verwertung der als N-Quelle angebotenen Antibiotika die Abnahme der Hemmhofradien zugrunde gelegt werden sollte, galt es zunächst, die Aktivität verschiedener Konzentrationen mit dem Agar-Loch-Diffusionstest zu ermitteln. Dabei wurde festgestellt, daß eine deutliche Abnahme der Hemmhofradien erst ab einer Konzentration von 10 mcg/ml für Bacitracin und Tetracyclin bzw. 1,0 mcg/ml für Penicillin zustande kommt (vgl. Tabelle 8), weshalb es für zweckmäßig gehalten wurde, die Antibiotika in diesen Konzentrationen einzusetzen.

Tabelle 8: Größe des Hemmhofradius in Abhängigkeit von der Antibiotikakonzentration

Konzentration mcg/ml	Hemmhof in Millimeter		
	Penicillin	Tetracyclin	Bacitracin
100	24,0	14,0	12,0
75	24,0	14,0	12,0
50	24,0	13,5	11,5
40	23,5	13,0	11,0
33	23,0	13,0	10,5
25	23,0	12,5	10,0
16	23,0	12,0	10,0
10	22,5	11,0	9,0
8	22,0	10,5	8,0
5	22,0	9,0	8,0
2,5	21,5	7,5	7,0
1,6	21,0	5,5	5,0
1,0	20,5	4,0	2,0
0,75	19,0	-	-
0,50	17,0	-	-
0,25	15,0	-	-
0,10	12,5	-	-

3.1.4.3 Durchführung des Agardiffusionsverfahrens zum Nachweis der Veränderung der antibiotischen Aktivität des Substrates

Die antibiotische Aktivität der beimpften und unbeimpften Nährmedien wurde mit dem Agar-Loch-Diffusionstest überprüft.

Als Testkeim diente *Bacillus stearothermophilus*, von dem eine Keimsuspension nach dem unter 3.1.3.2 angegebenen Verfahren hergestellt wurde. Gleichdicke DST-Agarplatten (Nährboden der Fa. Oxoid Code Nr. CM 261) wurden mit 0,5 ml Testkeimsuspension überschichtet und bei Zimmertemperatur getrocknet. Anschließend wurden mit einem sterilen Glasrohr Löcher von 15 mm Durchmesser in den Agar gestanzt und mit 0,15 ml der zu untersuchenden Flüssigkeit beschickt. Nach einer Diffusionszeit von einer halben Stunde bei Zimmertemperatur wurden die Platten 18 Stunden bei 68°C bebrütet. Die Größe des Hemmhofes diente als Maß für die noch vorhandene antibiotische Aktivität. Eine eventuelle Reduzierung der antibiotischen Aktivität, die auf Milieufaktoren zurückzuführen waren, konnte durch Vergleich der Hemmhofgrößen mit denen der unbeimpften Kontrollen festgestellt werden.

3.2 Ergebnisse und deren Besprechung

3.2.1 Resultate der Untersuchung von Schimmelpilzen auf Bildung von Stoffwechselprodukten mit antibiotischer Wirkung

3.2.1.1 Bestimmung der antibiotischen Aktivität der Anreicherungsflüssigkeit

Die Anreicherung von 153 Schimmelpilzstämmen der Gattungen *Aspergillus* und *Penicillium* in YES-Medium und die Prüfung auf antibiotische Aktivität dieser Nährlösung in der bereits beschriebenen Weise führte im einzelnen zu folgenden Ergebnissen.

Bei 64 Stämmen (= 41,84%) entsprach die antibiotische Aktivität 0,006 IE Penicillin-Äquivalenten/ml YES-Medium oder lag darunter. Höhere Aktivitäten, entsprechend den Penicillin-Aktivitäten von 0,012, 0,025, 0,05 und 0,1 IE/ml, waren bei einer annähernd gleichen Zahl von Stämmen nachzuweisen. Noch höhere antibiotische Aktivitäten konnten im Medium von 31

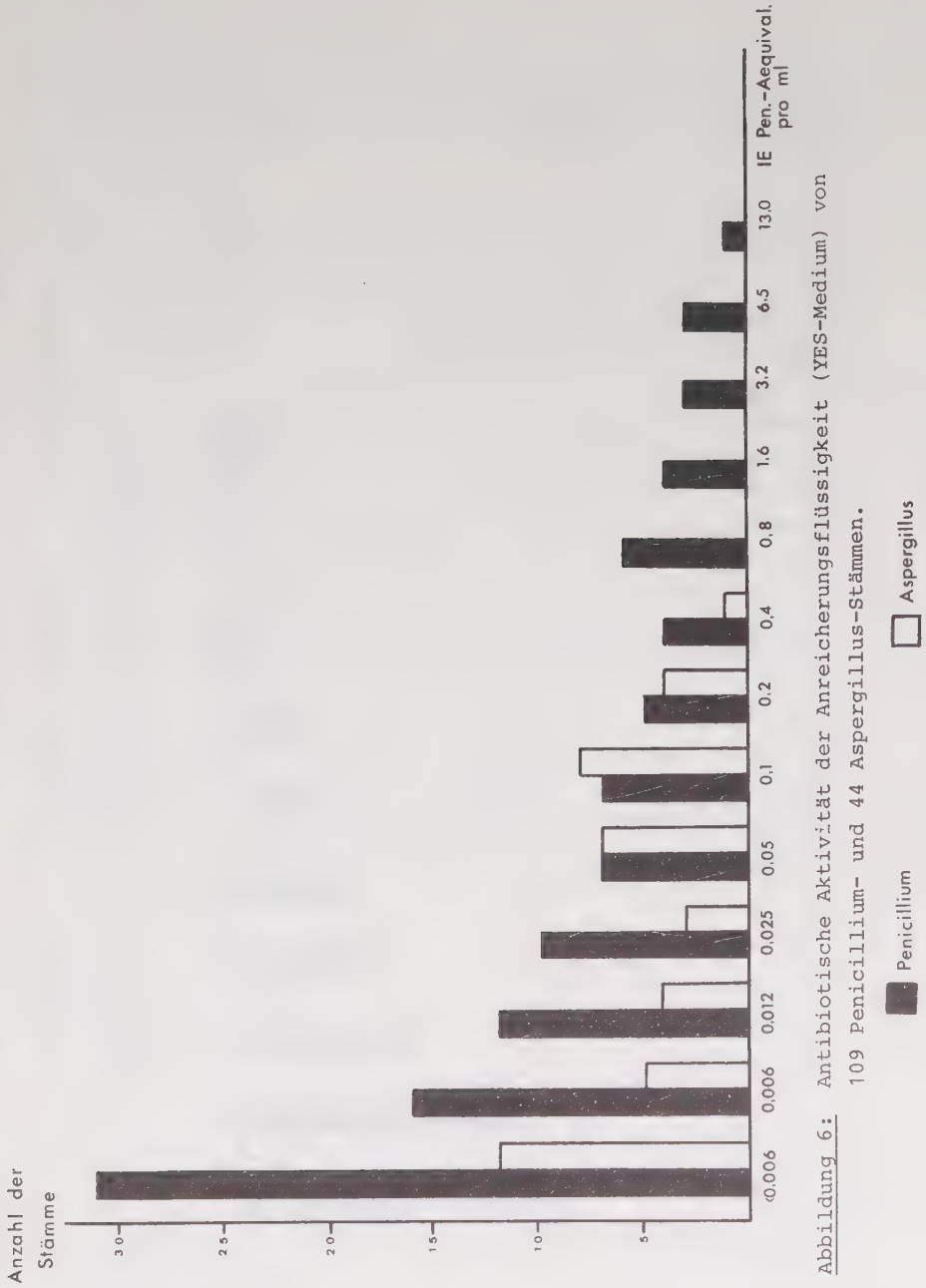
Stämmen (= 20,25%) festgestellt werden, wobei auffällt, daß mit steigender Verdünnung die Zahl der positiven Stämme geringer war (vgl. Tabelle 9).

Die von Laboratorien bezogenen Stämme zeigten ein ähnliches Verhalten. 5 von 13 Stämmen entwickelten Aktivitäten kleiner als oder gleich 0,006 IE Penicillin-Äquival./ml. Bei 4 Stämmen entsprach sie bis zu 0,1 IE Penicillin-Äquival./ml, und die Werte der restlichen 4 Stämme lagen bei 0,2 (2 Stämme), 0,4 und 6,5 IE Penicillin-Äquival./ml.

Tabelle 9: Prozentuale Verteilung der MHK-Werte der Anreicherungsflüssigkeit aller geprüften Stämme

Stufe der Wachstums- hemmung des Testkeimes (MHK-Wert)	Äquivalent Penicillin IE/ml YES- Medium	Anzahl der Stämme		
		aus Unter- suchungs- material	von Labora- torien	insgesamt in %
0	geringer als 0,006	40	3	28,10
1	0,006	19	2	13,74
2	0,012	15	1	10,45
3	0,025	12	1	8,50
4	0,05	12	2	9,16
5	0,1	15	0	9,80
6	0,2	7	2	5,88
7	0,4	4	1	3,26
8	0,8	6	0	3,93
9	1,6	4	0	2,61
10	3,2	3	0	1,96
11	6,5	2	1	1,96
12	13,0	1	0	0,65

Das Verteilungsbild der mit den Stämmen der Gattung *Penicillium* erzielten MHK-Werte wird von den am häufigsten isolierten Pilzen *P.cyclopium*, *P.roqueforti* und *P.islandicum* geprägt (vgl. Abb. 7). Dabei nehmen die Häufigkeitswerte der Stämme von *P.cyclopium* annähernd die Form des rechten Astes einer Gauß'schen Normalverteilungskurve an (vgl. Abb. 7).



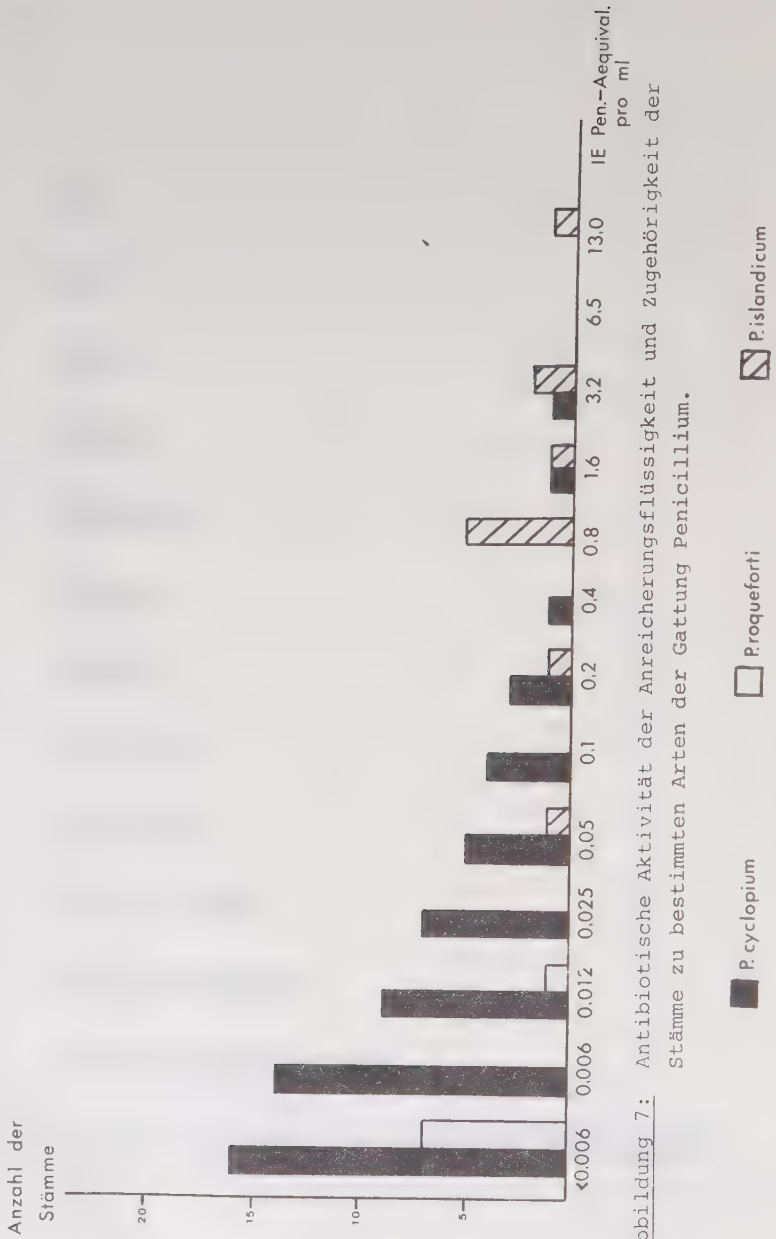


Abbildung 7: Antibiotische Aktivität der Anreicherungsflüssigkeit und Zugehörigkeit der Stämme zu bestimmten Arten der Gattung *Penicillium*.

Bei vielen *P.cyclopium*-Stämmen (16 St.) war überhaupt keine Aktivität (= weniger als 0,006 IE Pen.-Äquival./ml Anreicherungsflüssigkeit) nachzuweisen, während jeweils nur ein Stamm höhere Aktivitäten von 0,4, 1,6 und 3,2 IE Pen.-Äquival./ml entwickelte.

Die Anreicherungsflüssigkeiten von 7 der 8 untersuchten *P. roqueforti*-Stämmen zeigten keine meßbaren Aktivitäten, der eine Stamm jedoch 0,012 IE Pen.-Äquival./ml. Bei 5 von 11 *P.islandicum*-Stämmen entsprach die antibiotische Aktivität der Testmedien 0,8 IE Pen.-Äquival./ml, während bei denen der übrigen 6 Stämmen Werte zwischen 0,05 und 13,0 IE Pen.-Äquival./ml festgestellt werden konnten (vgl. Abb. 7). In den Anreicherungsmedien der restlichen 27 untersuchten *Penicillium*stämme, die verschiedenen Arten angehören, konnten Aktivitäten, die 0,006 (8 Stämme) bis 6,5 IE Pen.-Äquival./ml entsprechen, nachgewiesen werden (vgl. Tabelle 11).

Tabelle 10: Prozentuale Verteilung der MHK-Werte der Anreicherungsflüssigkeit der geprüften *Penicillium*stämme

Stufe der Wachstums- hemmung des Testkeimes (MHK-Wert)	Äquivalent Penicillin IE/ml YES- Medium	Anzahl der aus Unter- suchungs- material	Stämme von Labora- torien	insgesamt in %
0	geringer als 0,006	28	3	28,44
1	0,006	14	2	14,68
2	0,012	12	0	11,01
3	0,025	9	1	9,18
4	0,05	6	1	6,42
5	0,1	7	0	6,42
6	0,2	4	1	4,59
7	0,4	3	1	3,67
8	0,8	6	0	5,50
9	1,6	4	0	3,67
10	3,2	3	0	2,75
11	6,5	2	1	2,75
12	13,0	1	0	0,92

Tabelle 11: Verdünnungsstufe der Anreicherungsflüssigkeit, bei der noch eine Hemmung des Testkeimes festzustellen war und Zugehörigkeit der Stämme zu bestimmten Arten der Gattung *Penicillium*.

	Stufe der Wachstumshemmung des Testkeimes (MHK-Wert)												
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<i>P.canescens</i> SOPP	-	-	-	-	-	1	-	1	-	1	-	-	-
<i>P.chrysogenum</i> THOM	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1	-
<i>P.citrinum</i> THOM	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P.cyclopium</i> WESTLING	16	14	11	7	5	4	3	1	-	1	1	-	-
<i>P.expansum</i> LINK	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P.frequentans</i> WESTLING	2	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P.griseofulvum</i> DIERCKX	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-
<i>P.islandicum</i> SOPP	-	-	-	-	1	-	1	-	5	1	2	-	1
<i>P.martensii</i> BIOURGE	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P.notatum</i> WESTLING	-	-	-	-	1	-	1	-	-	1	-	-	-
<i>P.palitans</i> WESTLING	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P.patulum</i> BAINIER	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-
<i>P.roqueforti</i> THOM	7	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P.thomii</i> MAIRE	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P.variabale</i> SOPP	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	1	-
<i>P.viridicatum</i> WESTLING	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-
<i>P.spp.</i>	-	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-

Von den 44 untersuchten *Aspergillus*-Stämmen zeigte nur das Medium eines Stammes eine antibiotische Aktivität von 0,4 IE Pen.-Äquival./ml an. Mit den Anreicherungsflüssigkeiten von 17 Stämmen wurden Werte von kleiner oder gleich 0,006 IE Pen.-Äquival./ml erreicht, während von 7 bzw. 8 weiteren *Aspergillus*-Anreicherungen Aktivitäten von 0,05 bzw. 0,1 IE Pen.-Äquival./ml meßbar waren. Bei den restlichen 11 Stämmen entwickelten jeweils 4 im YES-Medium antibiotische Aktivitäten, die 0,012 und 0,2 IE Pen.-Äquival./ml entsprachen. Bei 3 Anreicherungen konnten Hemmwirkungen, die 0,025 IE Pen.-Äquival./ml gleichzusetzen sind, nachgewiesen werden. Das vermehrte Vorkommen von MHK-Werten, die 0,05 und 0,1 IE Pen.-Äquival./ml entsprechen, wurde hauptsächlich durch Stämme der Arten *A.nidulans* (3 von 4 untersuchten), *A.candidus* (5 von 10) und *A.fumigatus* (3 von 7) bewirkt. Keine nachweisbare oder nur geringe Aktivität (0,006 IE Pen.-Äquival./ml) war vorwiegend in Anreicherungsflüssigkeiten von Stämmen der Arten *A.repens* (5 von 6), *A.versicolor* (3 von 3) und *A.amstelodami* (2 von 2) festzustellen (vgl. Abb. 8 und Tabelle 13). Das Antibiotikabildungsvermögen von Stämmen der Arten *A.terreus*, *A.candidus* und *A.flavus* war recht unterschiedlich; die gemessenen Werte schwankten zwischen 0,006 und 0,1 bzw. 0,2 IE Pen.-Äquival./ml (vgl. Abb. 8 und Tabelle 13).

Tabelle 12: Prozentuale Verteilung der MHK-Werte der Anreicherungsflüssigkeit der geprüften *Aspergillus*-Stämme

Stufe der Wachstumshemmung des Testkeimes (MHK-Wert)	äquivalent Penicillin IE/ml YES-Medium	Anzahl der Stämme aus Untersuchungsmaterial	von Laboratorien	insgesamt in %
0	geringer als 0,006	12	0	27,28
1	0,006	5	0	11,36
2	0,012	3	1	9,09
3	0,025	3	0	6,82
4	0,05	6	1	15,91
5	0,1	8	0	18,18
6	0,2	3	1	9,09
7	0,4	1	0	2,27

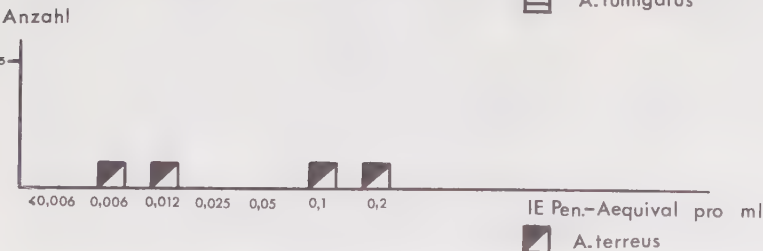
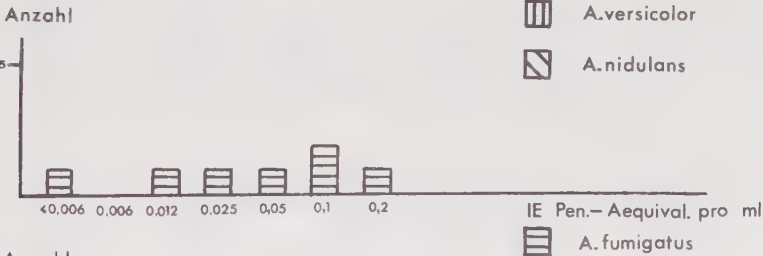
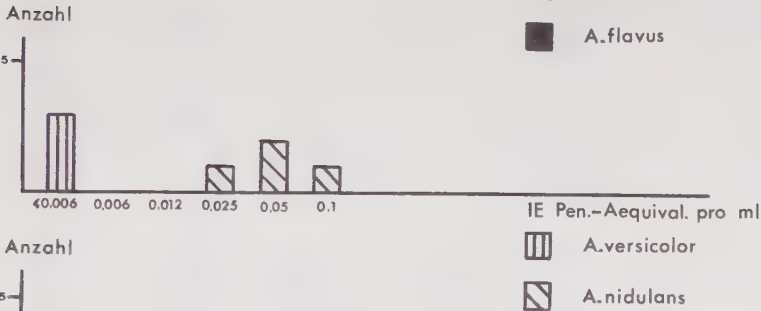
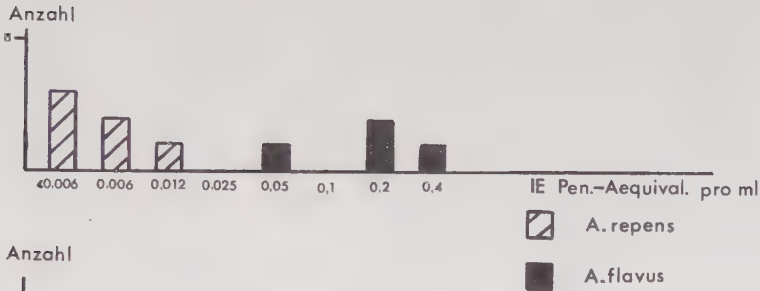
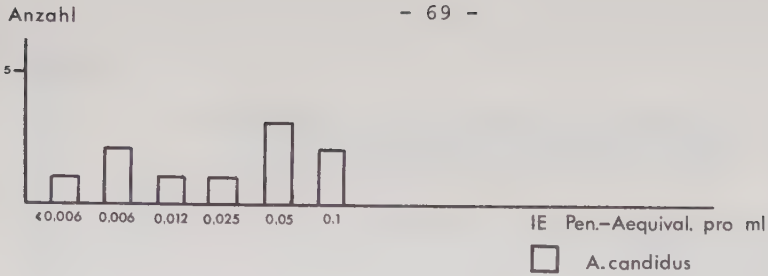


Abbildung 8: Antibiotische Aktivität der Anreicherungsflüssigkeit und Zugehörigkeit der Stämme zu bestimmten Arten der Gattung *Aspergillus*.

3.2.1.2 Ergebnis der Prüfung der antibiotischen Aktivität der Chloroformextrakte

Bei der Untersuchung der Anreicherung von 153 Stämmen der Gattungen *Aspergillus* und *Penicillium* mit dem beschriebenen Agardiffusionstest auf antibiotische Aktivität waren bei 85 Extrakten (55,56%) die Hemmhofradien kleiner als oder gleich 2 mm. Das entspricht einer antibiotischen Aktivität von $\leq 0,1$ mcg Penicillin G-Na-Äquivalent pro Extrakt. Die Angaben mcg Pen.-Äquival. pro Extrakt und mcg Penicillin pro Milliliter (vgl. Eichkurve, Abb. 9) entsprechen einander, da die aus den Pilzkulturen hergestellten Extrakte jeweils in einem Milliliter Chloroform gelöst worden waren.

Aktivitäten mit Hemmhöfen von 3 bis 8 mm (= 0,1 bis 0,5 mcg Pen.-Äquival. pro Extrakt) zeigten 56 Extrakte (36,60%), während nur von 12 Extrakten Hemmhofradien zwischen 9 und 11 mm (= 0,5 - 1,0 mcg Pen.-Äquival. pro Extrakt) meßbar waren. Über die Verteilung der Werte im einzelnen geben die Tabellen 16 und 18 Aufschluß.

Tabelle 14: Antibiotische Aktivität der aus Pilz und Anreicherungsflüssigkeit hergestellten Extrakte: prozentualer Anteil der Stämme mit bestimmten Hemmhofgrößen

Hemm- zonen in mm	Penicillin* Äquival. in mcg	Anzahl der aus Unter- suchungs- material	Stämme von Labo- ratorien	insgesamt in %
0		28	2	19,61
1		33	2	22,90
2	0,1	20	0	13,07
3		13	3	10,46
4		7	1	5,23
5		11	1	7,84
6		9	1	6,54
7		4	1	3,26
8	0,5	5	0	3,26
9		2	0	1,31
10		4	1	3,26
11	1,0	4	1	3,26

* 1,0 mcg = 1,666 IE

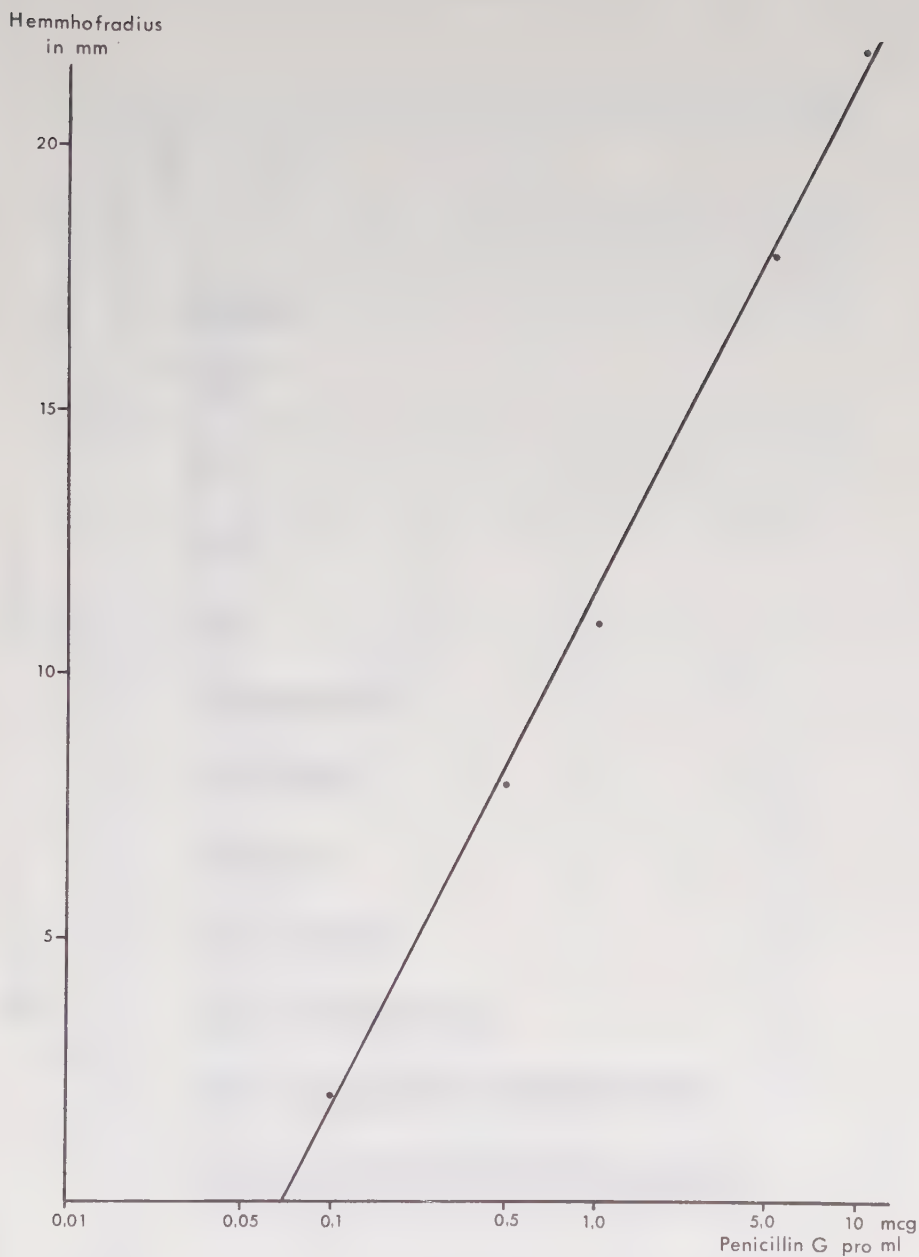


Abbildung 9: Abhängigkeit des Hemmhofes von der Penicillin-konzentration (Maßstab halblogarithmisch).

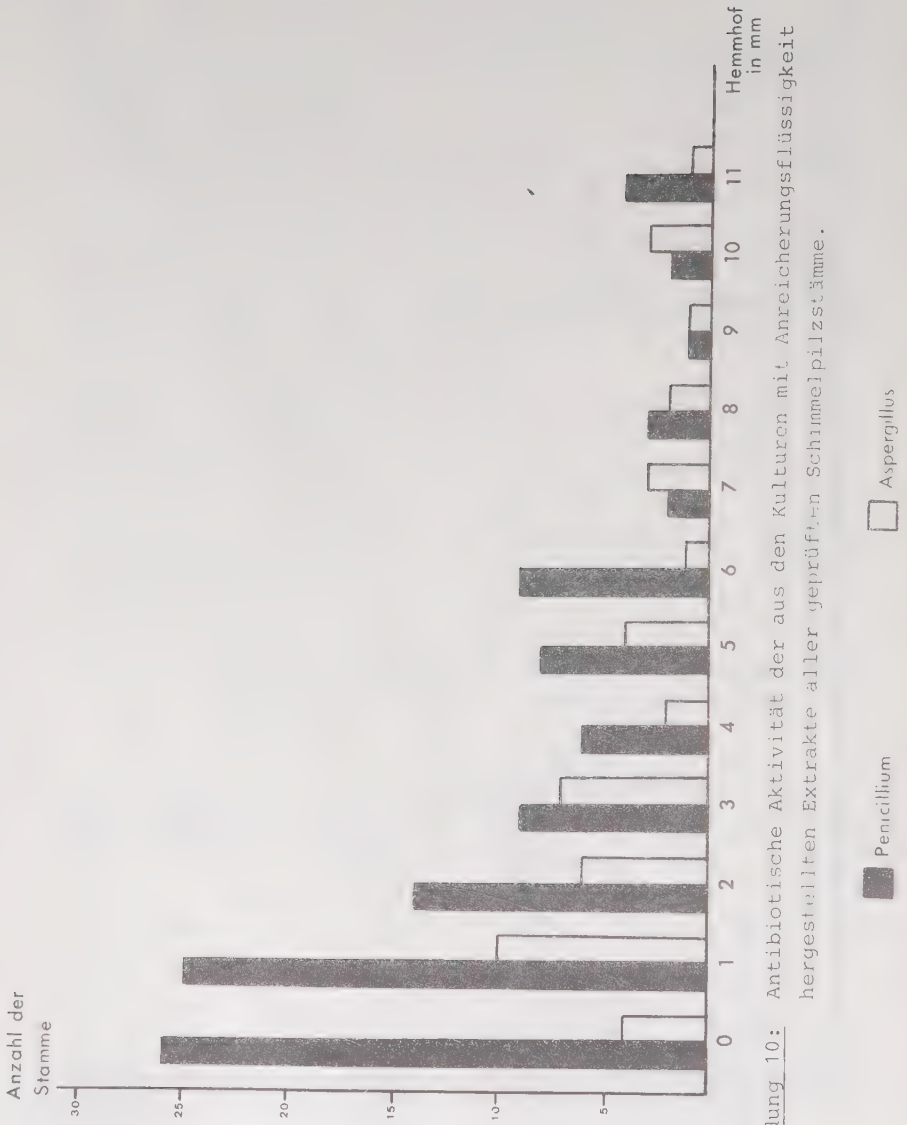


Abbildung 10:

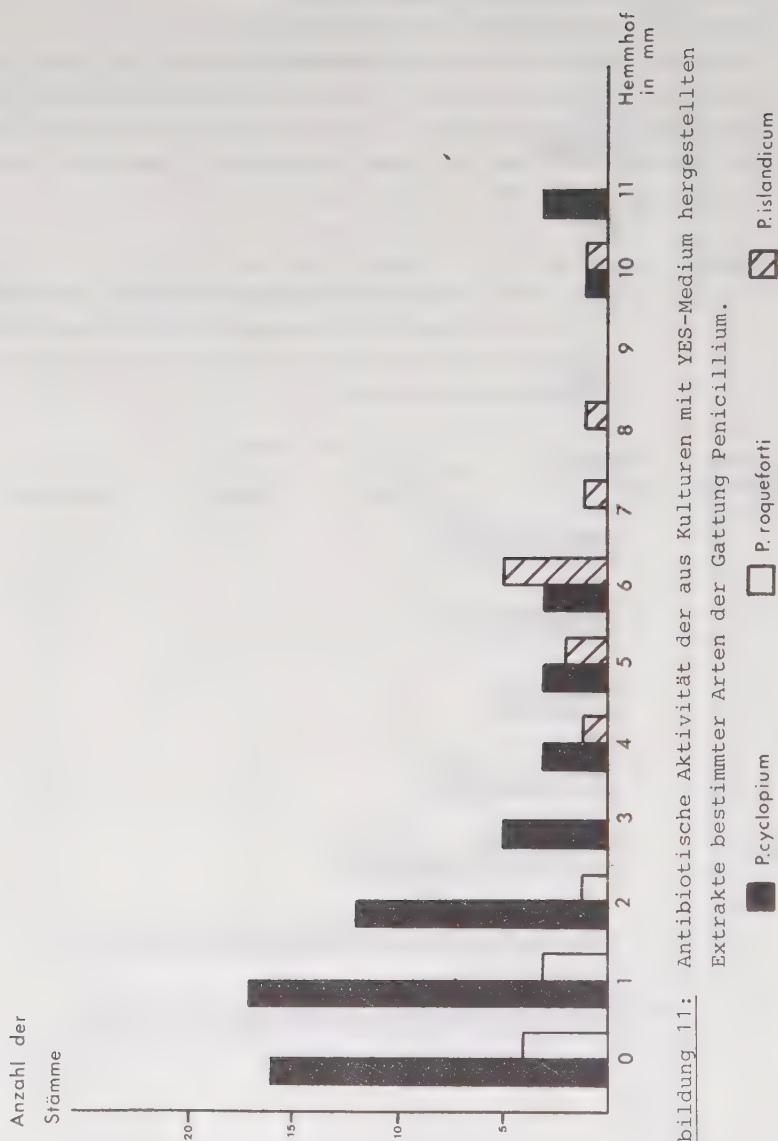
Hemmhöfe unterschiedlicher Größe verursachten bei den Penicillien vor allem die Extrakte der Stämme der Arten *P.cyclopium*, *P.islandicum* und *P.roqueforti*.

45 der 63 untersuchten *P.cyclopium*-Extrakte und alle 8 *P.roqueforti*-Extrakte zeigten Hemmzonen kleiner als oder gleich 2 mm. Bei den Extrakten der *P.islandicum*-Anreicherungen konnten Hemmhofradien zwischen 4 und 10 mm gemessen werden, wobei ein Hemmhof von 6 mm bei 6 der 11 geprüften Extrakte festzustellen war (vgl. Abb. 11 und Tabelle 16).

Tabelle 15: Radius der Hemmhöfe bei der Prüfung der Extrakte aus Pilz und Anreicherungsflüssigkeit auf anti-biotische Aktivität im Agardiffusionstest und prozentuale Verteilung auf die 109 geprüften *Penicillium*-Stämme

Hemm- zonen in mm	Penicillin* Äquival. in mcg	Anzahl der Stämme aus Unter- suchungs- material	von Labora- torien	insgesamt in %
0		24	2	23,85
1		23	2	22,94
2	0,1	14	0	12,84
3		7	2	8,26
4		5	1	5,50
5		8	0	7,34
6		8	1	8,26
7		2	0	1,83
8	0,5	3	0	2,75
9		1	0	0,92
10		1	1	1,83
11	1,0	3	1	3,67

* 1,0 mcg = 1,666 IE



Die aus den Anreicherungen der 44 *Aspergillus*-Stämme gewonnenen Extrakte zeigten Hemmzonen zwischen 0 und 11 mm. Hemmhofradien von 0 bis 2 mm ($\hat{=}$ 0 - 0,1 mcg Pen.-Äquival./Extrakt) und 3 bis 8 mm ($\hat{=}$ 0,1 - 0,5 mcg Pen.-Äquival./Extrakt) konnten bei 20 bzw. 19 Extrakten nachgewiesen werden, während die Extrakte von 5 Stämmen Hemmhöfe zwischen 9 und 11 mm entwickelten (vgl. Tabelle 17). Bei diesen 5 Extrakten handelte es sich ausschließlich um Anreicherungen der Art *A.fumigatus*. Extrakte der Arten *A.repens*, *A.versicolor* und *A.amstelodami* zeigten ausschließlich nur Hemmzonen bis zu 2 mm; die von den Extrakten der Arten *A.candidus* und *A.flavus* entwickelten Hemmzonen schwankten zwischen 0 und 7 mm bzw. 2 und 8 mm. Eine genaue Verteilung der Werte geben Tabelle 18 und Abb. 12 wieder.

Tabelle 17: Radius der Hemmhöfe bei der Prüfung der Extrakte aus Pilz und Anreicherungsflüssigkeit auf anti-biotische Aktivität im Agardiffusionstest und prozentuale Verteilung auf die 44 geprüften *Aspergillus*-Stämme

Hemm- zonen in mm	Penicillin Äquival. in mcg	* Anzahl der Stämme aus Unter- suchungs- material	von Labora- torien	insgesamt in %
0		4	0	9,09
1		10	0	22,72
2	0,1	6	0	13,64
3		6	1	15,91
4		2	0	2,55
5		3	1	9,09
6		1	0	2,27
7		2	1	6,82
8	0,5	2	0	4,55
9		1	0	2,27
10		3	0	6,82
11		1	0	2,27

* 1,0 mcg = 1,666 IE

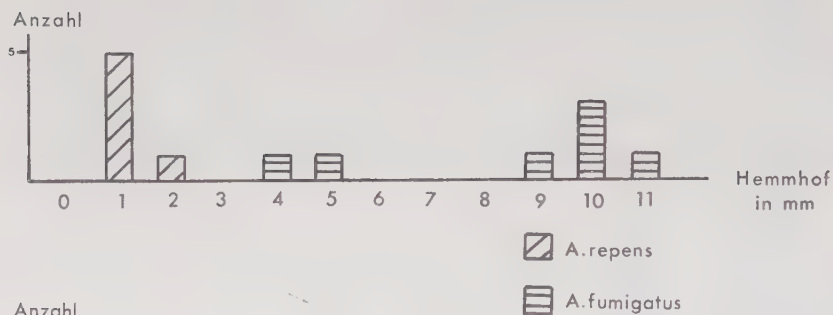
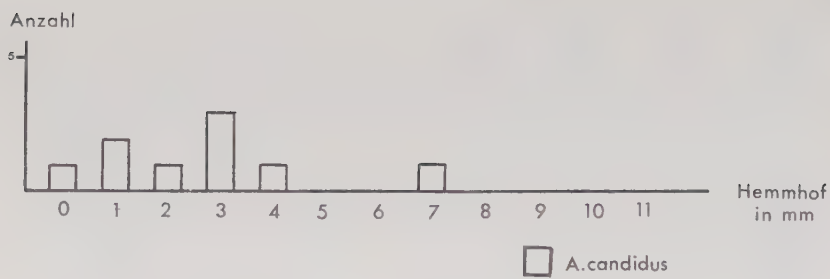


Abbildung 12: Antibiotische Aktivität der aus Kulturen mit YES-Medium hergestellten Extrakte bestimmter Arten der Gattung Aspergillus

3.2.1.3 Vergleich der Einzelergebnisse des Reihenverdünnungstestes mit denen des Agardiffusionstestes

In Tabelle 19 sind die Ergebnisse des Reihenverdünnungstestes und des Agardiffusionstestes für jeden einzelnen Stamm angegeben; auch die Resultate der Untersuchungen auf Bildung von Mykotoxinen wurden darin berücksichtigt. Daraus geht hervor, daß im Reihenverdünnungstest mit der Anreicherungsflüssigkeit höhere antibiotische Aktivitäten, bis zu 13,0 IE Pen.-Äquival./ml Anreicherungsflüssigkeit (entspricht 12. Stufe der Wachstumshemmung des Testkeimes), festgestellt werden konnten als bei den Chloroformextrakten, deren Aktivitäten, obwohl die gesamte Kultur extrahiert worden war, maximal nur 1,666 IE Pen.-Äquival./Extrakt (entspricht einem Hemmhofradius von 11 mm) betragen. Dies dürfte einmal darauf zurückzuführen sein, daß in den Extrakten nur chloroformlösliche Stoffe vorzufinden sind, jedoch nicht in dem Umfang wie in den Anreicherungsflüssigkeiten, da die Verteilung von Stoffen zwischen zwei nicht mischbaren Lösungsmitteln (hier Anreicherungsflüssigkeit und Chloroform) nach dem Nernst'schen Verteilungssatz erfolgt.

Zum anderen kommt noch hinzu, daß die Hemmhofgröße zwar durch die Menge eines Antibiotikums bestimmt wird, jedoch spielt bei verschiedenen antibiotischen Substanzen ihr unterschiedliches Diffusionsverhalten im Agar die wesentliche Rolle. Bei einigen Stämmen, wie z.B. *A.candidus* 235/75/1 und *P.cyclopium* 2112 (vgl. Tabelle 19), konnten antibiotische Aktivitäten im Chloroformextrakt festgestellt werden, während in der Anreicherungsflüssigkeit dieser Stämme keine nachzuweisen war. Dies dürfte damit zu erklären sein, daß sich die Substanzen mit antibiotischen Eigenschaften im Mycel des Pilzes befanden und nicht oder nur geringgradig an das YES-Medium abgegeben wurden.

Tabelle 19: Antibiotische Aktivität der Anreicherungsflüssigkeit, der aus den Kulturen hergestellten Extrakte und nachgewiesene Mykotoxine aller untersuchten Schimmelpilzstämmen.

Artzugehörigkeit	Stammbezeichnung	Stufe der Wachstums- hemmung des Testkeimes (MHK-Wert)	Hemm- zonen in mm	nachge- wiesene Myko- toxine
A.amstelodami	2814/10	0	1	
	81/75/1	0	2	
A.candidus	235/75/1	0	4	
	3025/3/74/1	1	0	
	225/75/2	1	2	
	56/75/1	2	7	
	307/75/1	3	1	
	88/75/2	4	3	
	276/75/2	4	3	
	62063	4	3	
	3014/2/74/2	5	1	
	86/75/4	5	4	
A.flavus	622 b/74	4	2	
	84/75/3	6	5	
	62066	6	7	
	302/75/2	7	8	
A.fumigatus	3185/2/73	0	9	
	1710/1b/74	2	4	
	1710/1c/74	3	5	
	3025/1/74/4	4	10	
	934/26/73	5	11	
	3708/75	5	10	
	2255/73	6	10	
A.montevidensis	2159/4 b	0	8	
A.nidulans	3301/2A/74	3	2	Sterigmato- cystin
	2159/4g	4	0	
	934/11/73	4	3	Sterigmato- cystin
	59/75/2	5	3	

Fortsetzung Tabelle 19

Artzugehörigkeit	Stammbezeichnung	Stufe der Wachstums- hemmung des Testkeimes (MHK-Wert)	Hemm- zonen in mm	nachge- wiesene Myko- toxine
A.ochraceus	3315/6/74	5	2	
A.repens	2739/2/74	0	1	
	37/1628/56	0	1	
	3/75/1	0	2	
	66/75/1	1	1	
	225/75/1	1	1	
	152/75/1	2	1	
A.sydowi	3/75/2	5	3	
A.terreus	314/75/4	1	7	
	62071	2	7	
	2814/5	5	5	
	2814/7	6	6	
A.ustus	2159/3g	0	0	
A.versicolor	2159/4x	0	0	
	2141/2/74	0	1	
	190/75/1	0	1	Sterigmato- cystin
P.canescens	2/75/1	5	5	
	4/75/4	7	5	
	21/75/2	9	2	
P.chrysogenum	525/12/74	8	8	
	58/75/2	11	9	
P.citrinum	62830	1	0	
P.cyclopium	2112	0	6	
	1988p	0	0	
	622 a/74	0	0	
	2141/1/74	0	0	
	61/2/74	0	0	
	6/75/2	0	0	
	4/75/1	0	0	
	4/75/2	0	0	
	1646/74/1	0	1	
	3025/1/74/3	0	1	
	2036/1/74	0	0	
	2581/2	0	0	Penicillin- säure

Fortsetzung Tabelle 19

Artzugehörigkeit	Stammbezeichnung	Stufe der Wachstums- hemmung des Testkeimes (MHK-Wert)	Hemm- zonen in mm	nachge- wiesene Myko- toxine
P.cyclopium	283/75/1	0	0	
	254/75/1	0	1	
	284/75/1	0	2	
	62838	0	3	
	3014/2/74/1	1	0	
	6/75/3	1	0	
	2619/1/74	1	1	Penicillin- säure
	2814/14	1	1	
	2814/15	1	1	
	8/75/1	1	1	
	21/75/3	1	1	Penicillin- säure
	314/75/2	1	1	Penicillin- säure
	2907/1	1	2	Penicillin- säure
	4/75/3	1	2	Penicillin- säure
	70/75/3	1	2	
	221/75/1	1	2	Citrinin u. Ochratoxin A
	242/75/1	1	2	
	284/75/2	1	2	
	2619/3/74	2	1	Penicillin- säure
	2762/6/74	2	1	Penicillin- säure
	3025/3/74/2	2	1	Penicillin- säure
	27/75/1	2	1	Penicillin- säure
	70/75/8	2	1	Penicillin- säure
	85/75/1	2	1	
	1472/74	2	2	Penicillin- säure

Fortsetzung Tabelle 19

Artzugehörigkeit	Stammbezeichnung	Stufe der Wachstums- hemmung des Testkeimes (MHK-Wert)	Hemm- zonen in mm	nachge- wiesene Myko- toxine
P.cyclopium	2739/1/P1	2	2	Penicillin- säure
	2739/1/P2	2	2	Penicillin- säure
	86/75/3	2	3	Penicillin- säure
	70/75/6	2	5	
	25/75/2	3	0	
	220/75/1	3	0	
	2646/74	3	1	
	220/75/2	3	1	
	251/75/2	3	2	
	251/75/3	3	3	
	86/75/2	3	5	
	228/75/2	4	0	
	26/75/1	4	1	Penicillin- säure
	25/75/1	4	3	
	220/75/3	4	4	Penicillin- säure
	86/75/1	4	11	Penicillin- säure
	58/75/1	5	4	
	70/75/5	5	4	
	223/75/3	5	5	Penicillin- säure
	222/75/1	5	6	
	81/75/2	6	3	
	223/75/2	6	6	
	241/75/1	6	10	
	276/75/3	7	2	
	223/75/1	9	11	
	203/75/2	10	11	
P.expansum	62841	0	1	
	1988/73	0	4	
P.frequentans	950/57/73	0	0	
	950/69/73	0	0	
	62843	1	4	
P.griseofulvum	25/75/3	5	8	

Fortsetzung Tabelle 19

Artzugehörigkeit	Stammbezeichnung	Stufe der Wachstums- hemmung des Testkeimes (MHK-Wert)	Hemm- zonen in mm	nachge- wiesene Myko- toxine
P. islandicum	84/75/2	4	4	Luteoskyrin
	62845	6	10	Luteoskyrin
	312/75/1	8	5	Luteoskyrin
	2159/4	8	6	Luteoskyrin
	67/75/1	8	6	Luteoskyrin
	276/75/4	8	7	Luteoskyrin
	3137	8	8	Luteoskyrin
	235/75/2	9	6	Luteoskyrin
	309/75/1	10	5	Luteoskyrin
	311/75/1	10	6	Luteoskyrin
	2236/3/74	12	6	Luteoskyrin
P. martensii	2036/1b/74	0	1	
P. notatum	62857	4	11	
	934/23/73	6	5	
	2461/73	9	3	
P. palitans	2036/1a/74	0	0	
P. patulum	62862	7	6	
P. roqueforti	525/7/74 b	0	0	
	708/6/74	0	0	
	1527/9/74	0	0	
	1758/10/74	0	0	
	311/74	0	1	
	1527/13a/74	0	1	
	1527/13b/74	0	1	
	525/6/74a	2	2	
P. thomii	276/75/2	3	1	
P. variable	2159/3b	3	1	
	62877	3	3	
	290/75/1	11	7	
P. viridicatum	525/7/74a	0	0	
	62878	0	1	
	18411	11	0	
P. spp.	70/75/1	5	3	
	18/75/3	7	3	

3.2.1.4 Bildung von bestimmten antibiotischen Stoffen mit toxischer Wirkung

Bei der Untersuchung der Chloroformextrakte von 153 Schimmelpilzanreicherungen der Gattungen *Aspergillus* und *Penicillium*, die sich auf das Vorhandensein der Mykotoxine Aflatoxin B₁, Aflatoxin G₁, Citrinin, Luteoskyrin, Ochratoxin A, Penicillinsäure und Sterigmatocystin erstreckte, konnten insgesamt 34 Stämme (= 22,22%) als Bildner solcher Stoffwechselprodukte identifiziert werden.

In keinem Extrakt konnte jedoch Aflatoxin B₁ oder Aflatoxin G₁ nachgewiesen werden.

Citrinin und Ochratoxin A wurden nur in dem Extrakt des Stammes *P.cyclopium* vorgefunden. Die Extrakte von 3 Stämmen enthielten Sterigmatocystin, von denen 2 der Art *A.nidulans* und einer der Art *A.versicolor* angehörte.

Die Bildung von Luteoskyrin war bei allen 11 angereicherten *P.islandicum*-Stämmen nachzuweisen.

Penicillinsäure wurde am häufigsten in den Extrakten vorgefunden. 19 der 153 untersuchten Schimmelpilzstämme bildeten dieses Toxin, die alle der Art *P.cyclopium* angehören. Nimmt man die 63 untersuchten Stämme dieser Art als Berechnungsgrundlage, so war annähernd jeder dritte *P.cyclopium*-Stamm zur Synthese dieses Mykotoxins in der Lage.

Von den aus Laboratorien bezogenen Schimmelpilzstämmen bildete nur der Stamm *P.islandicum* Luteoskyrin, während die übrigen 12 Stämme keines der anderen gesuchten Toxine synthetisierten.

3.2.2 Resultate der Untersuchung auf Abbau von Antibiotika durch Schimmelpilze der Gattungen *Aspergillus* und *Penicillium*

Bei der Überprüfung von 16 Schimmelpilzstämmen der Gattung *Penicillium* und 14 Schimmelpilzstämmen der Gattung *Aspergillus* in der beschriebenen Weise auf die Befähigung zum Abbau von Antibiotika mit zuvor bestimmter antibiotischer Aktivitäten gegenüber dem Testkeim *Bacillus stearothermophilus* wurden mit den einzelnen Stoffen recht unterschiedliche Resultate erzielt.

Tabelle 20: Bildung bekannter Mykotoxine mit antibiotischen Eigenschaften durch die 153 geprüften Stämme der Gattungen *Penicillium* und *Aspergillus*

Art des Mykotoxins	Anzahl toxin- bildender Stämme	Prozentualer Anteil an der Gesamtzahl geprüfter Stämme	Anteil positiver Stämme der gleichen Art
Penicillinsäure	19	12,42	19/63
Luteoskyrin	11	7,19	11/11
Stearigmatocystin	3	1,96	2/4
Citrinin	*		1/3
Ochratoxin A	1	0,65	1/63
	*		
	1		

1
8
6
1

* Beide Mykotoxine wurden von dem gleichen Stamm, nämlich von *P. cyclopium* WESTLING 221/75/1 gebildet.

3.2.2.1 Prüfung auf Abbau von Tetracyclin

Es konnte festgestellt werden, daß keiner der geprüften Schimmelpilzstämmen in der Lage war, die antibiotische Aktivität der verwendeten Tetracyclin-Base meßbar zu beeinflussen. Weder im gepufferten noch im ungepufferten Medium zeigten sich wesentliche Abweichungen der Hemmhofgrößen der mit Schimmelpilzsporen beimpften "Tetracyclin-Nährlösungen" von denen der unbeimpften Kontrollen. Die Werte bewegten sich stets in der von den Kontrollen angezeigten Schwankungsbreite.

Im gepufferten Medium (pH 4,5) nahmen die Hemmhofradien während der gesamten Versuchsdauer nur geringfügig ab, und auch die pH-Werte blieben annähernd stabil bei pH 4,5 (vgl. Abb. 13 und Tabelle 21).

In dem mit Kaliumnitrat angereicherten Kontrollnährmedium bildeten nur die Stämme *P.islandicum* 2236/3/74 und 2159/4 und *P.expansum* 1988 Stoffe mit nennenswerter antibiotischer Aktivität. Die allmähliche Zunahme der Hemmhöfe während des Versuches ist in der Abbildung dargestellt. Da die Werte weit unter denen der Tetracyclin-Base lagen, konnte ein eventuell stattgefundenen Tetracyclin-Abbau dadurch allerdings nicht überdeckt werden. Die übrigen Teststämmen entwickelten noch geringere antibiotische Aktivitäten in diesem Kontrollmedium und blieben deshalb in der graphischen Darstellung unberücksichtigt.

Im ungepufferten Medium mit Tetracyclin-Base nahmen die Hemmhofradien dagegen in den ersten 3 Tagen stark ab, reduzierten sich aber während der weiteren Versuchsdauer nur noch geringfügig. Diese starke Abnahme dürfte auf einen für Tetracyclin-Base ungünstigen pH-Wert des Ausgangsmediums beruht haben, da auch die antibiotischen Aktivitäten in den unbeimpften Kontrollen in gleicher Weise abnahmen. Nach einigen Tagen stellten sich, durch die Stoffwechselaktivität der Pilze bedingt, unterschiedliche pH-Werte ein (pH 6,14 - 2,80). Ein Einfluß dieser verschiedenen pH-Werte auf die noch vorhandene Restaktivität war nicht meßbar (vgl. Tabelle 22).

Die Abnahme meßbarer antibiotischer Aktivitäten während der Versuchszeit gibt Abbildung 14 wieder.

Tab. 21: Ergebnisse der Überprüfung von Hemmhofgröße und pH-Wert während der Untersuchung des Abbaues von Tetracyclin-Base im gepufferten Medium (pH 4,5) durch Schimmelpilze

Stamm- bezeichnung	Art- zugehörigkeit	Zeitpunkt der Untersuchung					
		*		14. Tag		28. Tag	
		Hemmhofra- dius in mm	pH	Hemmhofra- dius in mm	pH	Hemmhofra- dius in mm	pH
2814/10	A.amstelodami	12,0	4,50	11,0	4,51	11,0	4,50
86/75/4	A.candidus	11,5	4,51	12,0	4,54	11,0	4,50
88/75/2		11,5	4,51	12,0	4,48	11,0	4,53
3185/2/73	A.fumigatus	12,0	4,50	11,0	4,48	11,5	4,50
1710/1b/74		12,0	4,50	11,5	4,51	11,5	4,53
622b	A.flavus	12,0	4,50	11,5	4,53	11,0	4,51
2159/4g	A.nidulans	12,0	4,50	11,0	4,48	10,5	4,50
934/11/73		12,0	4,51	11,0	4,50	11,0	4,49
3301/2A/74		11,5	4,51	12,0	4,50	10,5	4,48
2814/5	A.terreus	12,0	4,50	11,5	4,51	11,5	4,50
2814/7		12,0	4,50	11,5	4,53	11,5	4,50
2159/3g	A.ustus	12,0	4,50	11,5	4,53	11,5	4,56
2159/4x	A.versicolor	12,0	4,51	11,0	4,54	11,0	4,52
190/75/1		11,5	4,51	12,0	4,54	11,0	4,50
525/12/74	P.chrysogenum	12,0	4,51	10,5	4,49	10,5	4,48
1988p	P.cyclopium	12,0	4,51	11,5	4,50	10,5	4,51
2112		12,0	4,51	11,0	4,49	11,0	4,52
1988	P.expansum	12,0	4,52	11,5	4,49	11,0	4,50
950/57/73	P.frequentans	12,0	4,50	10,5	4,51	10,5	4,51
950/69/73		11,5	4,51	12,0	4,50	11,0	4,45
2236/3/74	P.islandicum	12,0	4,50	10,5	4,28	10,0	4,25
2159/4		12,0	4,50	11,0	4,13	10,5	3,95
2036/1b/74	P.martensii	11,5	4,51	12,0	4,50	11,0	4,46
934/23/1973	P.notatum	12,0	4,50	10,5	4,50	10,5	4,53
2461/73		12,0	4,50	11,0	4,51	11,5	4,53
2036/1a/74	P.palitans	12,0	4,52	11,0	4,47	11,0	4,50
708/6/74	P.roqueforti	11,5	4,51	10,5	4,51	10,0	4,52
311/74		12,0	4,51	11,0	4,51	11,0	4,51
2159/3b	P.variabile	12,0	4,50	10,5	4,51	10,5	4,48
525/7/74a	P.viridicatum	12,0	4,50	11,0	4,49	11,5	4,51
Kontrollen, unbeimpft		11,5- 12,0	4,50- 4,52	10,5- 12,0	4,50- 4,52	10,5- 11,5	4,50- 4,53

* Ausgangswerte

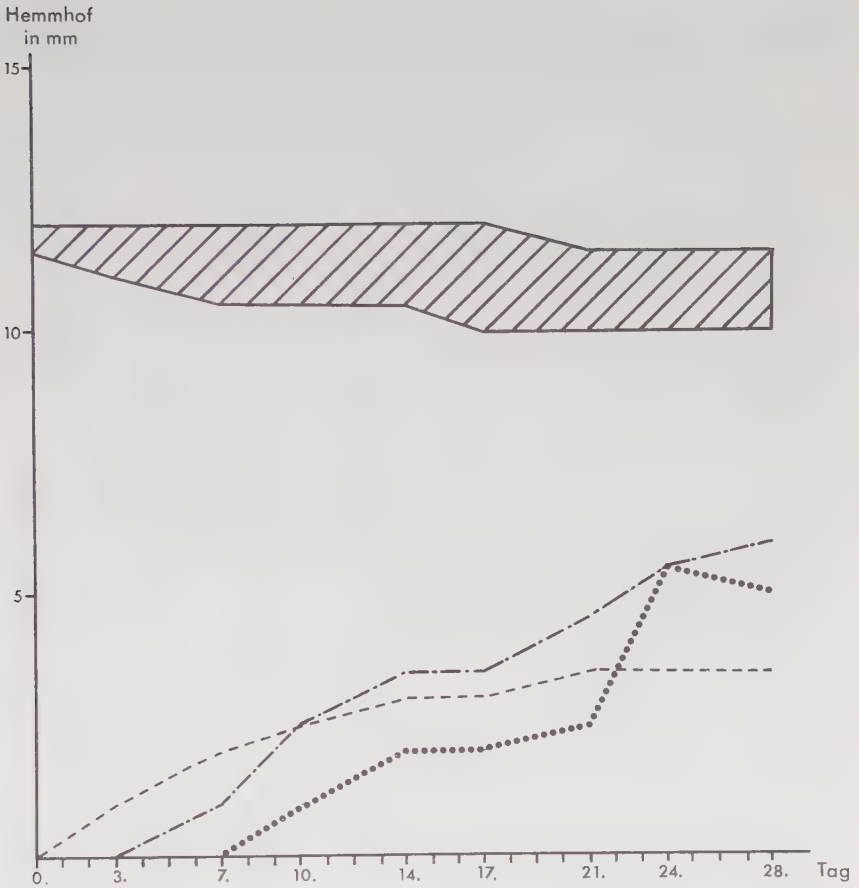


Abb. 13: Hemmhofradien zu verschiedenen Zeiten der Prüfung auf Abbau von Tetracyclin-Base (Medium gepuffert, pH 4,50).



Schwankungsbreite der Werte der beimpften antibiotikahaltigen C-Base; in diesem Bereich lagen auch die Werte der unbeimpften Kontrollen.

Im Kontrollmedium C-Base mit KNO_3 (gepuffert, 4,50) bei bestimmten Stämmen nachweisbare antibiotische Aktivität:

- · — · — · P.expansum 1988/73
- — — — — P.islandicum 2236/3/74
- · · · · P.islandicum 2159/4

Tab. 22: Ergebnisse der Überprüfung von Hemmhofgröße und pH-Wert während der Untersuchung des Abbaues von Tetracyclin-Base im ungepufferten Medium durch Schimmelpilze

Stamm- bezeichnung	Art- zugehörigkeit	Zeitpunkt der Untersuchung					
		1. Tag*		14. Tag		28. Tag	
		Hemmhofra- dius in mm	pH	Hemmhofra- dius in mm	pH	Hemmhofra- dius in mm	pH
2814/10	A.amstelodami	12,0	5,95	6,0	5,30	4,5	4,82
86/75/4	A.candidus	12,0	5,84	5,5	6,10	5,5	5,97
88/75/2		12,0	5,84	5,5	6,12	6,0	6,01
3185/2/73	A.fumigatus	12,5	5,83	6,0	5,82	5,5	5,70
1710/1b/74		12,5	5,83	6,5	5,82	4,5	5,81
622b	A.flavus	12,0	5,95	6,0	4,61	4,5	4,50
2159/4g	A.nidulans	12,0	5,95	7,0	5,91	5,0	5,86
934/11/73		11,5	5,84	6,0	5,80	5,0	5,76
3301/2A/74		12,0	5,84	5,5	5,88	6,0	5,62
2814/5	A.terreus	12,5	5,83	6,5	5,84	4,5	5,76
2814/7		12,0	5,95	6,0	5,75	5,0	5,75
2159/3g	A.ustus	12,5	5,83	6,0	5,71	5,0	5,62
2159/4x	A.versicolor	11,5	5,84	6,0	5,54	5,5	5,56
190/75/1		12,0	5,84	5,5	6,10	6,5	5,80
525/12/74	P.chrysogenum	12,0	5,95	7,0	5,39	5,0	5,86
1988p	P.cyclopium	11,5	5,84	6,5	4,71	5,5	4,47
2112		11,5	5,84	6,5	4,05	6,0	3,89
1988	P.expansum	12,0	5,95	6,0	4,16	6,5	4,08
950/57/73	P.frequentans	12,0	5,94	6,5	3,96	5,0	3,90
950/69/73		12,0	5,84	5,5	4,55	6,0	4,14
2236/3/74	P.islandicum	12,0	5,94	6,5	3,02	5,0	2,88
2159/4		12,0	5,95	5,0	2,91	5,5	3,02
2036/1b/74	P.martensii	12,0	5,84	5,5	3,62	6,0	3,50
934/23/1973	P.notatum	12,0	5,95	7,0	5,45	5,0	5,36
2461/73		12,5	5,83	6,5	4,51	5,0	4,14
2036/1a/74	P.palitans	12,0	5,95	6,0	4,01	4,5	3,95
708/6/74	P.roqueforti	11,5	5,85	6,0	5,70	4,5	5,65
311/74		11,5	5,84	6,0	5,35	5,5	4,80
2159/3b	P.variabile	12,0	5,96	7,0	3,37	5,0	3,09
525/7/74a	P.viridicatum	12,5	5,83	6,5	4,20	5,5	3,86
Kontrollen, unbeimpft		11,5- 12,5	5,83- 5,96	5,5- 6,5	5,75- 5,96	4,5- 5,5	5,79- 6,00

* Ausgangswerte

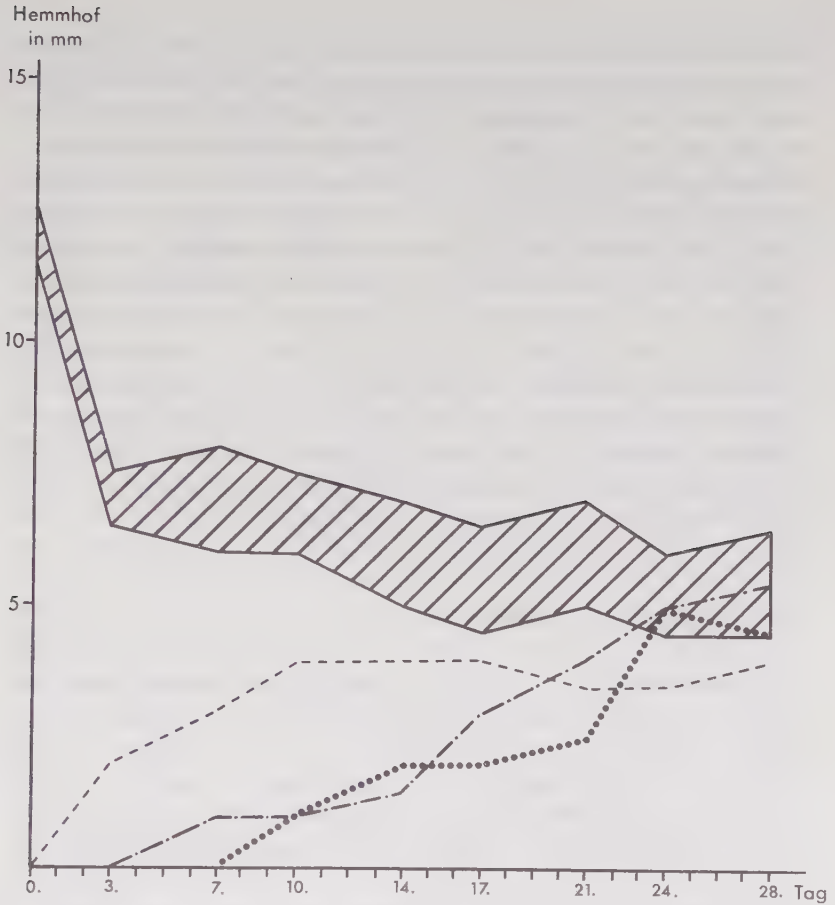


Abb. 14: Hemmhofradien zu den verschiedenen Zeiten der Prüfung auf Abbau von Tetracyclin-Base (Medium ungepuffert).



Schwankungsbreite der Werte der beimpften antibiotika-haltigen C-Base; in diesem Bereich lagen auch die Werte der unbeimpften Kontrollen.

Im Kontrollmedium C-Base mit KNO_3 (ungepuffert) bei bestimmten Stämmen nachweisbare antibiotische Aktivität:

— · — · — · *P.expansum* 1988/73

— — — — — *P.islandicum* 2236/3/74

..... *P.islandicum* 2159/4

Im antibiotikafreien Kontrollmedium (Carbon-Base + Kaliumnitrat) bildeten wiederum die Stämme *P.islandicum* 2236/3/74 und 2159/4 und *P.expansum* 1988 die Stoffe mit höheren antibiotischen Aktivitäten als alle anderen geprüften Stämme. Die Werte und das zeitliche Auftreten während des Versuches sind ebenfalls Abbildung 14 zu entnehmen. Sie veranschaulicht, daß es im letzten Viertel des Versuches zu einer teilweisen Überlagerung der Hemmhöfe der gemessenen antibiotischen Aktivitäten mit denen des Tetracyclins kommt, wodurch ein eventueller Abbau von Tetracyclin durch diese 3 Stämme letztlich nicht auszuschließen ist. Dagegen spricht jedoch das Verhalten der Stämme im gepufferten Medium, in dem sie eine derartige Eigenschaft nicht vermuten ließen. Die übrigen 27 Stämme zeigten im Kontrollmedium keine oder nur geringe antibiotische Aktivität (maximal 2 mm Hemmhof).

3.2.2.2 Prüfung auf Abbau von Penicillin

Bei den Abbauntersuchungen von Penicillin zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen gepuffertem und ungepuffertem Medium.

In der bei pH 6,0 gepufferten Nährlösung konnten nur die Stämme *P.cyclopium* 2112, *P.frequentans* 950/69/73, *P.islandicum* 2236/3/74 und *P.islandicum* 2159/4 eine Reduzierung der antibiotischen Aktivität und damit der Hemmhofgrößen herbeiführen. Am 28. Tage betrugen die Hemnzonen 15,0, 16,0, 12,5 und 6,0 mm, während die Werte der Kontrollen zwischen 17,0 und 18,5 mm lagen. Es zeigte sich, daß die Pufferkapazität des verwendeten Phosphat-Citrat-Puffers in allen diesen Fällen nicht ausreichte, um die pH-Werte bei 6,0 zu halten; sie sanken während des Versuches auf 5,48, 5,35, 5,20 oder 5,09 ab.

Die Hemmhofradien und die pH-Werte der mit Sporen der übrigen 26 Schimmelpilzstämmen beimpften, penicillinhaltigen Kulturmedien lagen im Schwankungsbereich der unbeimpften Kontrollen (vgl. Abb. 15 und Tabelle 23). Das Ausmaß der Produktion antibiotischer Aktivitäten in der mit Kaliumnitrat angereicherten und bei pH 6,0 gepufferten Nährlösung entsprach in etwa den

bei pH 4,5 gepufferten Kontrollmedien. *P.islandicum* 2236/3/73, *P.islandicum* 2159/4 und *P.expansum* 1988 veranlaßten auch hier die Bildung der größten Hemmhöfe (6 mm), wobei die Maximalwerte erst gegen Ende der Versuchszeit meßbar wurden. So ist gegen Versuchsende bei dem Stamm *P.islandicum* 2159/4 eine eventuelle Überdeckung abgebauten Penicillins durch neu hinzugebildete antibiotische Substanzen nicht auszuschließen. Bei den übrigen Stämmen war in diesem Kontrollmedium keine oder nur geringe antibiotische Aktivität (Hemmhofwerte 0 - 2 mm) zu verzeichnen.

In der ungepufferten Nährlösung waren 12 Stämme in der Lage, die antibiotische Aktivität des zugesetzten Penicillins innerhalb von 28 Tagen völlig abzubauen. Das mit Sporen von *P.expansum* 1988/73 beimpfte Nährmedium wies am 21. Versuchstag einen Hemmhof von 4 mm bei pH 4,05 auf, wobei das mit Kaliumnitrat ergänzte Kontrollmedium einen Hemmhof von 4,5 mm bei pH 4,08 zeigte. Dies deutet darauf hin, daß es sich dabei nicht mehr um eine Restaktivität des eingesetzten Penicillins handeln dürfte, sondern um eine von diesem Stamm selbst produzierte antibiotische Aktivität.

A.amstelodami reduzierte den Hemmhof innerhalb den 28 Tagen auf 13,5 mm bei einem pH-Wert von 4,80. Die unbeimpften Kontrollen ergaben zu Versuchsende noch Hemmhöfe zwischen 17 und 18 mm (pH-Werte: 5,83 - 6,01). Im penicillinfreien, kaliumnitrathaltigen Kontrollmedium zeigten *P.islandicum* 2236/3/74, *P.islandicum* 2159/4 und *P.expansum* die stärkste Zunahme an antibiotischer Aktivität (vgl. Abb. 14); sie konnten dadurch jedoch nicht den Abbau des Penicillins vollständig überdecken. Es kam bei diesen drei Stämmen, nachdem das zugesetzte Penicillin vollständig oder teilweise abgebaut war, zu einer erneuten Zunahme der Hemmhofradien (vgl. Abb. 16). Die restlichen 16 Stämme konnten die antibiotische Aktivität des zugesetzten Penicillins dagegen nicht meßbar beeinflussen (vgl. Tabelle 25).

Auffällig war, daß es sowohl im gepufferten als auch im ungepufferten Medium nur dann zu einer Abnahme der antibiotischen Aktivität des Penicillins kam, wenn die pH-Werte absanken. Dies läßt vermuten, daß diese Schimmelpilze nicht direkt

Tab. 23: Ergebnisse der Überprüfung von Hemmhofgröße und pH-Wert während der Untersuchung des Abbaues von Penicillin G im gepufferten Medium (pH 6,0) durch Schimmelpilze.

Stamm- bezeichnung	Art- zugehörigkeit	Zeitpunkt der Untersuchung					
		1. Tag*		14. Tag		28. Tag	
		Hemmhofra- dius in mm	pH	Hemmhofra- dius in mm	pH	Hemmhofra- dius in mm	pH
2814/10	A.amstelodami	21,0	6,02	20,5	5,95	18,0	5,97
86/75/4	A.candidus	21,0	6,01	19,5	6,03	17,0	5,96
88/75/2		21,0	6,01	19,5	6,00	17,0	5,94
3185/2/73	A.fumigatus	20,0	6,01	18,0	5,98	17,5	6,02
1710/1b/74		20,0	6,01	19,0	6,01	17,0	6,04
622b	A.flavus	21,0	6,02	19,5	6,01	18,0	5,99
2159/4g	A.nidulans	20,0	6,00	18,0	5,98	17,0	6,02
934/11/73		20,0	6,02	19,0	5,98	17,0	6,02
3301/2A/74		21,0	6,01	19,5	5,99	17,5	5,90
2814/5	A.terreus	20,0	6,01	19,0	6,00	17,0	6,03
2814/7		21,0	6,02	19,0	6,03	18,0	6,01
2159/3g	A.ustus	20,0	6,01	18,5	6,04	18,0	6,06
2159/4x	A.versicolor	20,0	6,02	19,0	6,01	17,0	5,93
190/75/1		21,0	6,01	19,5	6,02	17,5	5,98
525/12/74	P.chrysogenum	20,0	6,01	18,0	5,99	17,0	6,01
1988p	P.cyclopium	20,0	6,02	18,5	6,00	16,5	5,95
2112		20,0	6,02	18,5	5,65	<u>15,0</u>	5,35
1988	P.expansum	21,0	6,02	19,0	5,97	17,0	6,03
950/57/73	P.frequentans	20,0	6,00	18,5	5,80	17,0	5,60
950/69/73		21,0	6,01	19,0	5,73	16,0	5,48
2236/3/74	P.islandicum	20,0	6,00	<u>15,0</u>	5,40	<u>12,5</u>	5,20
2159/4		21,0	6,00	<u>14,5</u>	4,95	<u>6,0</u>	5,09
2036/1b/74	P.martensii	21,0	6,01	19,0	5,85	16,5	5,45
934/23/1973	P.notatum	20,0	6,00	18,5	6,00	17,0	5,96
2461/73		20,0	6,01	18,0	5,99	18,0	6,04
2036/1a/74	P.palitans	21,0	6,02	20,0	5,90	18,0	5,61
708/6/74	P.roqueforti	20,0	6,02	19,0	6,01	16,5	6,01
311/74		20,0	6,02	18,5	6,01	17,0	6,05
2159/3b	P.variabile	20,0	6,00	18,5	6,00	17,0	5,85
525/7/74a	P.viridicatum	20,0	6,01	19,5	6,04	18,0	6,04
Kontrollen, unbeimpft		20,0- 21,0	6,00- 6,02	18,5- 19,5	5,98- 6,02	17,0- 18,5	6,00- 6,01

* Ausgangswerte

Hemmhof
in mm

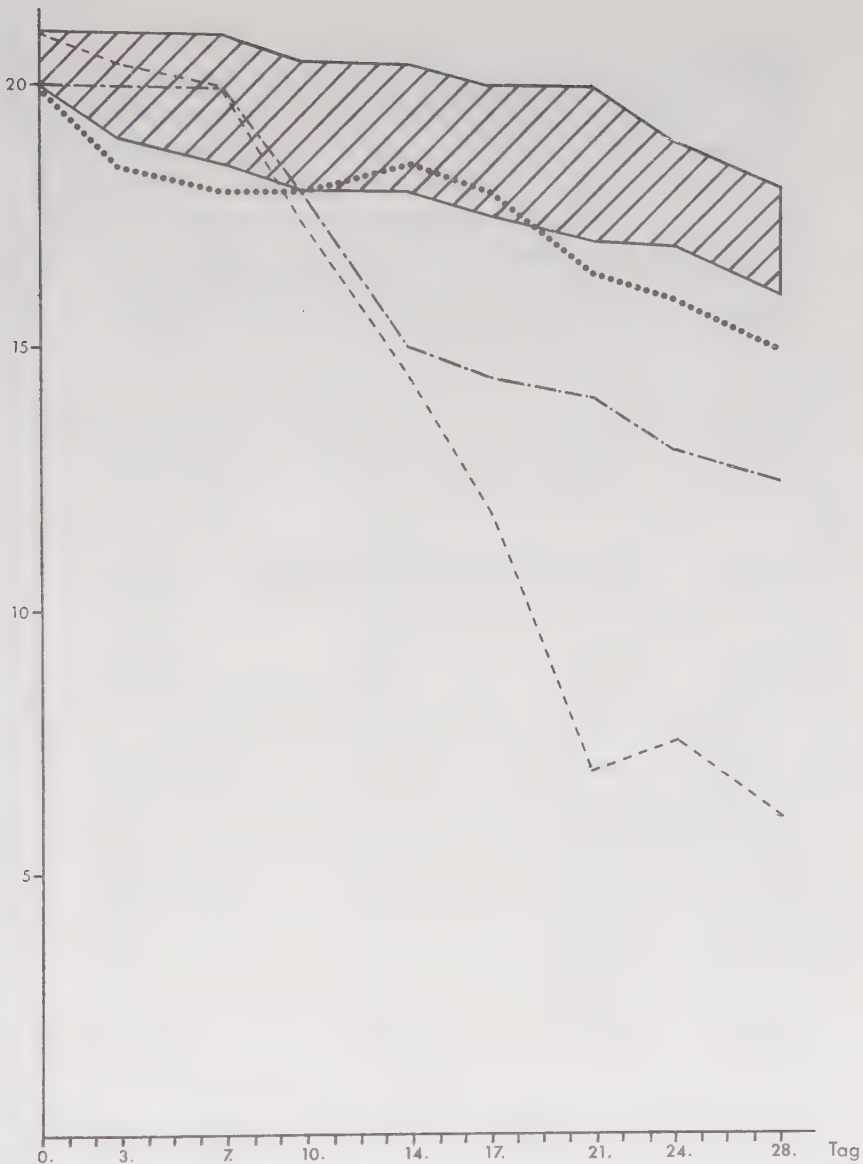
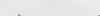


Abb. 15: Hemmhofradien zu den verschiedenen Zeiten der Prüfung auf Abbau von Penicillin G-Na (Medium gepuffert, pH 6.0).

 Schwankungsbreite der Werte der beimpften antibiotikahaltigen C-Base, die im Bereich derer der unbeimpften Kontrollen lagen.

Bestimmte Stämme konnten die antibiot. Akt. meßbar reduzieren:

 *P. islandicum* 2159/4  *P. cyclopium* 2112
 *P. islandicum* 2236/3/74

Penicillin angriffen, sondern es durch die Produktion von Säuren, die das Absinken des pH-Wertes bewirken, in eine inaktive Form übergeführt wurde. Trägt man die jeweiligen Zeitpunkte, an denen kein Penicillin mehr nachzuweisen war und die diesem Versuchstag entsprechenden pH-Werte in ein Koordinatensystem ein, so läßt sich eine Tendenz dahingehend erkennen, daß der Inaktivierungszeitraum umso kürzer ist, je stärker der pH-Wert der Kulturflüssigkeit absinkt (vgl. Abb. 17 und Tabelle 24). Dies unterstützt die oben ausgesprochene Vermutung.

Tabelle 24: Verzeichnis der Stämme mit Befähigung zur Inaktivierung von Penicillin innerhalb 28 Tagen im ungepufferten Medium

Art-zugehörigkeit	Stamm-bezeichnung	Versuchstag, an dem kein Penicillin mehr nachzuweisen war	pH-Wert an diesem Tag
<i>P.cyclopium</i>	2112	14.	4,00
<i>P.cyclopium</i>	1988p	28.	4,41
<i>P.frequentans</i>	950/57/73	10.	3,90
<i>P.frequentans</i>	950/69/73	21.	4,41
<i>P.islandicum</i>	2159/4	3.	3,37
<i>P.islandicum</i>	2236/3/74	7.	3,20
<i>P.martensii</i>	2036/1b/74	10.	3,68
<i>P.notatum</i>	2461/73	24.	4,11
<i>P.palitans</i>	2036/1a/74	21.	3,91
<i>P.variabile</i>	2159/3b	14.	3,67
<i>P.viridicatum</i>	525/7/74a	17.	4,01
<i>A.flavus</i>	622b/74	24.	4,66

Tab. 25: Ergebnisse der Überprüfung von Hemmhofgröße und pH-Wert während der Untersuchung des Abbaues von Penicillin G im ungepufferten Medium durch Schimmelpilze.

Stamm- bezeichnung	Art- zugehörigkeit	Zeitpunkt der Untersuchung					
		1. Tag*		14. Tag		28. Tag	
		Hemmhofra- dius in mm	pH	Hemmhofra- dius in mm	pH	Hemmhofra- dius in mm	pH
2814/10	A.amstelodami	20,0	5,95	18,0	5,59	<u>13,5</u>	4,80
86/75/4	A.candidus	20,5	5,84	19,0	5,95	17,0	5,83
88/75/2		20,5	5,84	19,0	6,13	18,0	6,14
3185/2/73	A.fumigatus	19,5	5,85	18,0	5,86	18,0	5,73
1710/1b/74		19,5	5,85	17,5	5,87	17,5	5,86
622b	A.flavus	20,5	5,95	<u>14,0</u>	4,60	<u>0,0</u>	4,62
2159/4g	A.nidulans	20,0	5,94	19,0	5,87	18,0	5,86
934/11/73		20,0	5,86	18,0	5,80	17,5	5,78
3301/2A/74		20,5	5,84	19,0	5,95	18,0	5,65
2814/5	A.terreus	19,5	5,85	17,5	5,85	17,5	5,80
2814/7		20,5	5,94	18,5	5,70	17,0	5,73
2159/3g	A.ustus	19,5	5,85	18,0	5,75	18,0	5,72
2159/4x	A.versicolor	20,0	5,86	18,0	5,60	17,0	5,61
190/75/1		20,5	5,84	18,5	6,06	17,5	5,89
525/12/74	P.chrysogenum	20,0	5,95	18,5	5,88	17,5	5,84
1988p	P.cyclopium	20,0	5,86	<u>13,0</u>	4,55	<u>0,0</u>	4,41
2112		20,0	5,86	<u>0,0</u>	4,00	<u>0,0</u>	3,85
1988	P.expansum	20,5	5,95	<u>12,5</u>	4,46	<u>6,0</u>	4,40
950/57/73	P.frequentans	20,0	5,91	<u>0,0</u>	3,85	<u>0,0</u>	3,84
950/69/73		20,5	5,84	<u>9,5</u>	4,60	<u>0,0</u>	4,14
2236/3/74	P.islandicum	20,0	5,94	<u>0,0</u>	3,05	<u>2,5</u>	2,98
2159/4		20,0	5,95	<u>0,0</u>	2,94	<u>4,0</u>	3,12
2036/1b/74	P.martensii	20,5	5,84	<u>0,0</u>	3,60	<u>0,0</u>	3,50
934/23/1973	P.notatum	20,0	5,95	18,0	5,43	17,0	5,41
2461/73		19,5	5,85	<u>13,0</u>	4,49	<u>0,0</u>	4,18
2036/1a/74	P.palitans	20,5	5,95	<u>15,0</u>	4,20	<u>0,0</u>	3,92
708/6/74	P.roqueforti	20,0	5,85	18,0	5,70	17,0	5,71
311/74		20,0	5,86	18,0	5,38	16,5	5,00
2159/3b	P.variabile	20,0	5,93	<u>0,0</u>	3,67	<u>0,0</u>	3,11
525/7/74a	P.viridicatum	19,5	5,85	<u>9,0</u>	4,17	<u>2,0</u>	3,72
Kontrollen, unbeimpft		19,5- 20,5	5,84- 5,95	18,0- 19,0	5,80- 5,96	17,0- 18,0	5,83- 6,00

* Ausgangswerte

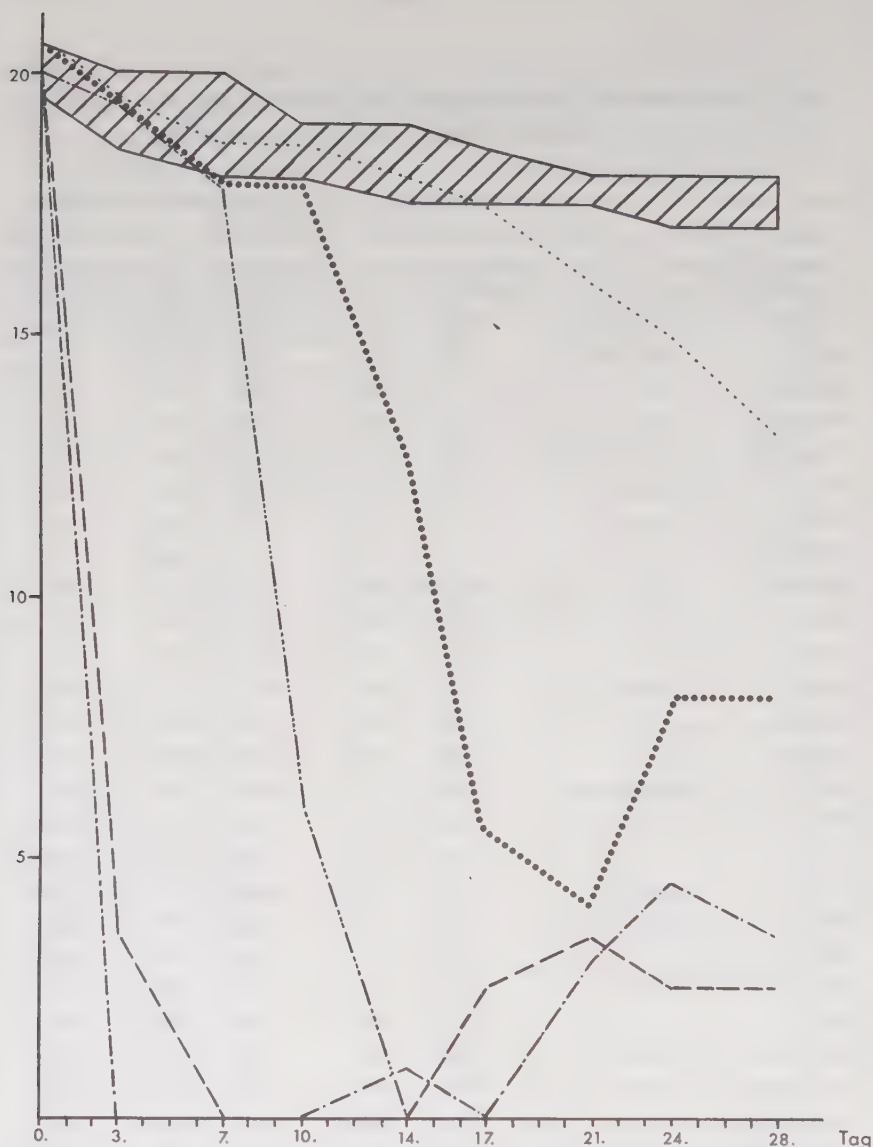


Abb. 16: Hemmhofradien zu verschiedenen Zeiten der Prüfung auf Abbau von Penicillin G-Na (Medium ungepuffert)



Schwankungsbreite der Werte der beimpften antibiotika-haltigen C-Base, die im Bereich derer der unbeimpften Kontrollen lagen.

Bestimmte Stämme konnten die antibiot. Akt. meßbar reduzieren:

- • — • — *P. islandicum* 2159/4
- — — — *P. islandicum* 2236/3/74
- • • • • *P. expansum* 1988/73
- — — — *A. amstelodami* 2814/10
- — — — *P. variabile* 2159/3b

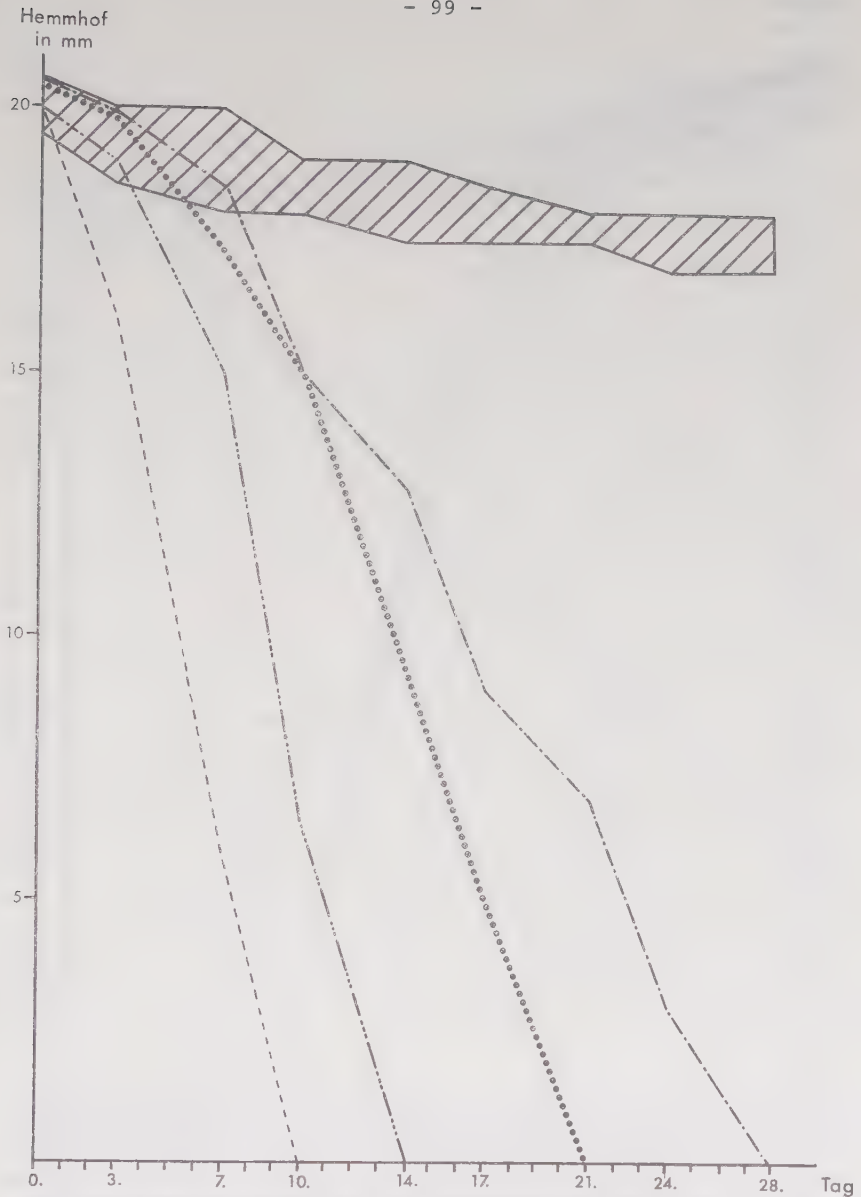


Abb. 16a: Hemmhofradien zu den verschiedenen Zeiten der Prüfung auf Abbau von Penicillin G-Na (Medium ungepuffert).



Schwankungsbreite der Werte der beimpften antibiotika-
haltigen C-Base, die im Bereich derer der unbeimpften
Kontrollen lagen

Bestimmte Stämme konnten die antibiot. Akt. meßbar reduzieren:

- | | |
|--------------------------------|--------------------------------|
| ----- P. frequentans 950/57/73 | P. frequentans 950/69/73 |
| - . - . - . P. cyclopium 2112 | — · — · — P. cyclopium 1988p |

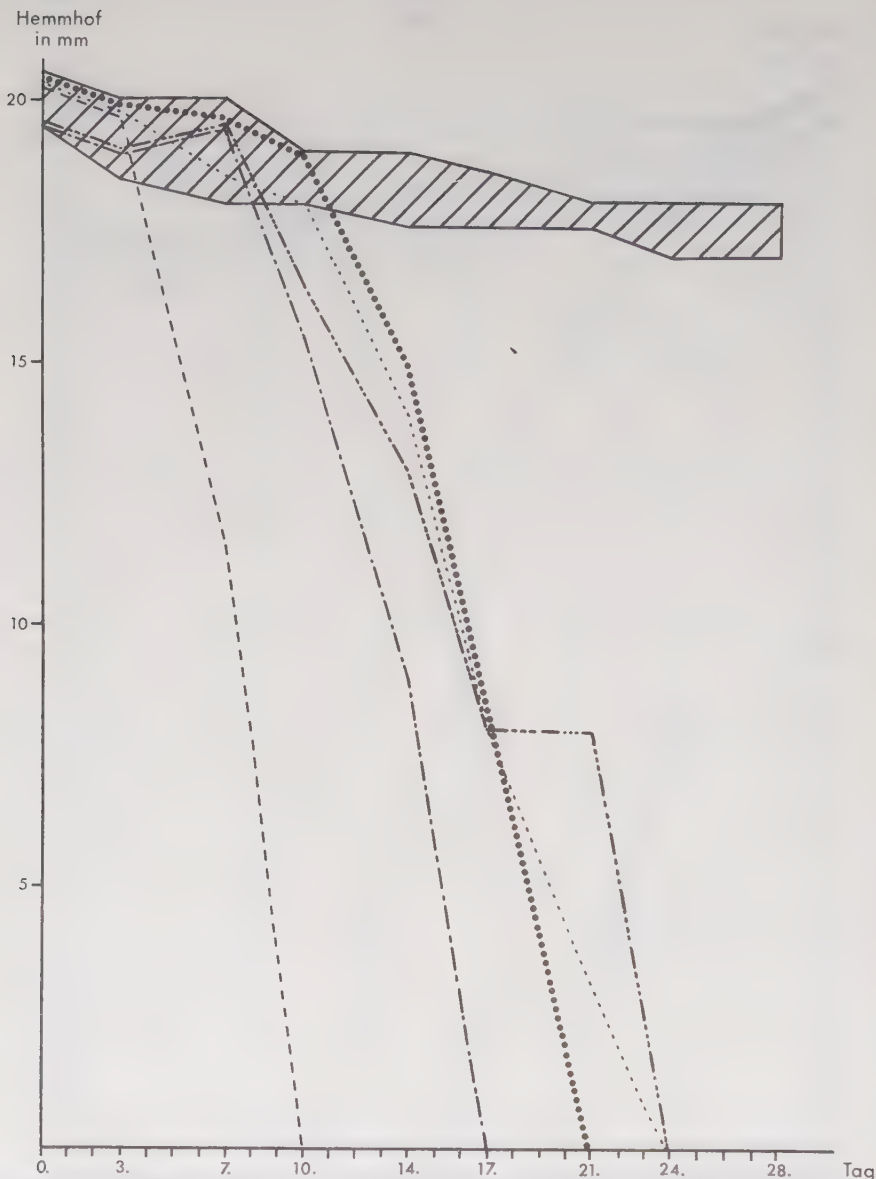


Abb. 16b: Hemmhofradien zu den verschiedenen Zeiten der Prüfung auf Abbau von Penicillin G-Na (Medium ungepuffert).



Schwankungsbreite der Werte der beimpften antibiotika-haltigen C-Base, die im Bereich derer der unbeimpften Kontrollen lagen.

Bestimmte Stämme konnten die antibiot. Akt. meßbar reduzieren:

----- P.martensii 2036/1b/74

----- A.flavus 622 b/74

-.-.-.-.- P.viridicatum 525/7/74a

-.-.-.-.- P.notatum 2461/73

..... P.palitans 2036/1a/74

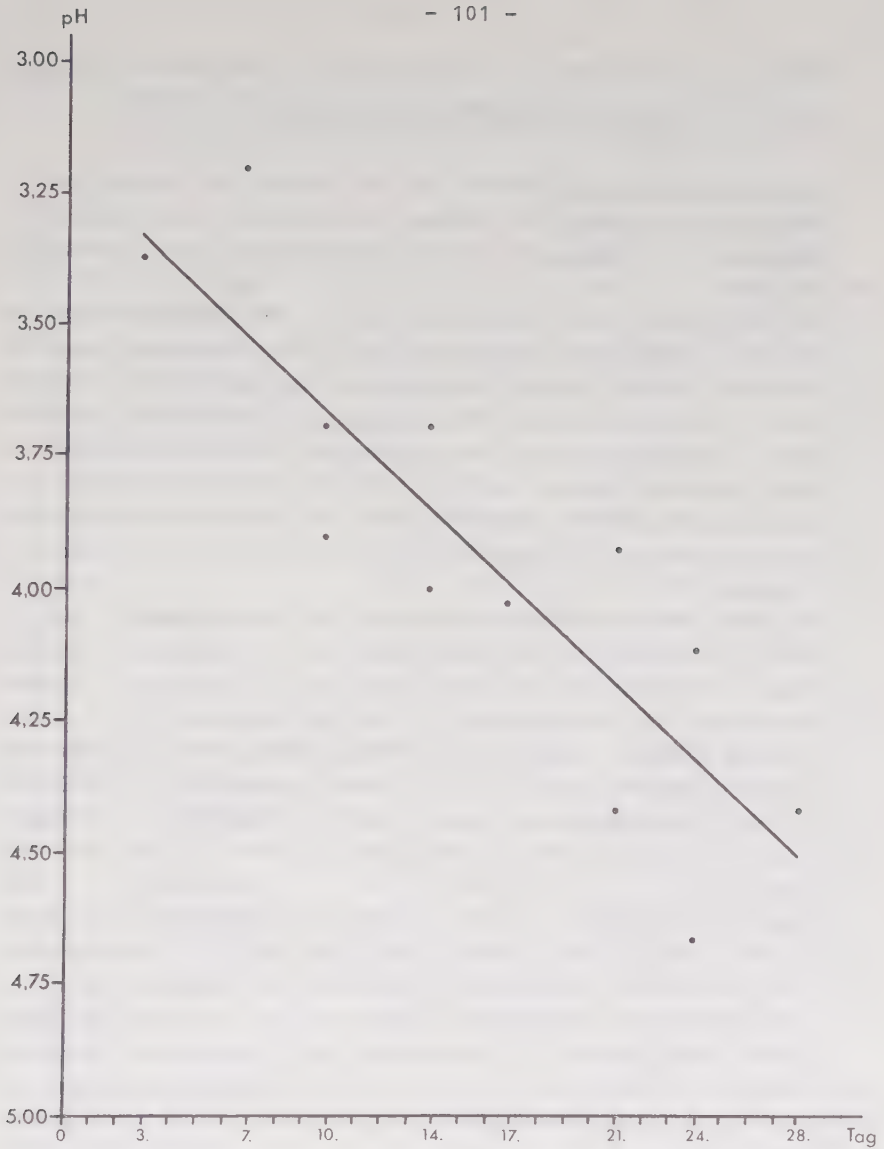


Abb. 17: Beziehung zwischen der Inaktivierungszeit des Penicillins und dem pH-Wert der Nährlösung.

— Regression $\text{pH} = 3,17 + 0,048t$ (WEBER, 1972)

3.2.2.3 Prüfung auf Abbau von Bacitracin

Die antibiotische Aktivität des dem Nährmedium zugesetzten Bacitracins konnten vier Stämme beeinflussen, von denen drei der Spezies *A.nidulans* und einer der Spezies *A.ustus* angehörten.

In gepufferten Nährlösungen wurde die antibiotische Aktivität nur geringgradig reduziert. Am 28. Tag lagen die Hemmhofwerte der mit *A.nidulans*-Sporen beimpften Nährmedien um 0,5 - 2,0 mm unter denen der unbeimpften Kontrollen. Die mit *A.ustus*-Sporen versetzte bacitracinhaltige Nährlösung wies eine Hemmhofdifferenz von 4 mm auf. Die übrigen 26 Stämme konnten die antibiotische Aktivität des Bacitracins weder in gepufferten noch in ungepufferten Nährlösungen meßbar beeinflussen.

Im ungepufferten Nährmedium waren diese vier Stämme in der Lage, die Aktivität des zugesetzten Bacitracins total abzubauen. Die pH-Werte sanken im Vergleich zu denen der unbeimpften Kontrollen nur unwesentlich ab (vgl. Tabelle 27), so daß es sich hierbei nicht um eine Inaktivierung durch ungünstige pH-Verhältnisse, sondern nur um einen echten Bacitracinabbau durch die Schimmelpilzstämme *A.nidulans* 2159/4g, *A.nidulans* 934/11/73, *A.nidulans* 3301/2A/74 und *A.ustus* 2159/3g handeln kann.

Wegen der Zubildung antibiotischer Stoffe durch die Schimmelpilze *P.islandicum* 2236/3/74 und 2159/4 und von *P.expansum* 1988 in den mit Kaliumnitrat angereicherten Kontrollmedien (gepuffert und ungepuffert) läßt sich über die Abbaufähigkeit dieser drei Stämme keine Aussage machen, weil es im letzten Viertel des Versuches zu einer Überlagerung der Werte der Kontrollen mit den Hemmhofradien des noch aktiven Bacitracins kam.

Tab. 26: Ergebnisse der Überprüfung von Hemmhofgröße und pH-Wert während der Untersuchung des Abbaues von Bacitracin im gepufferten Medium (pH 4,5) durch Schimmelpilze.

Stamm- bezeichnung	Art- zugehörigkeit	Zeitpunkt der Untersuchung					
		1. Tag [*]		14. Tag		28. Tag	
		Hemmhofra- dius in mm	pH	Hemmhofra- dius in mm	pH	Hemmhofra- dius in mm	pH
2814/10	A.amstelodami	8,5	4,50	7,0	4,51	5,5	4,50
86/75/4	A.candidus	8,5	4,51	8,0	4,51	6,0	4,47
88/75/2		8,5	4,51	8,0	4,48	6,5	4,52
3185/2/73	A.fumigatus	8,0	4,50	8,0	4,53	6,5	4,52
1710/1b/74		8,0	4,50	7,0	4,53	7,0	4,53
622b	A.flavus	8,0	4,50	7,0	4,49	6,0	4,50
2159/4g	A.nidulans	8,0	4,50	7,0	4,51	5,0	4,50
934/11/73		9,5	4,51	8,5	4,54	<u>3,5</u>	4,51
3301/2A/74		8,5	4,51	7,0	4,50	<u>4,5</u>	4,51
2814/5	A.terreus	8,0	4,50	7,5	4,51	7,0	4,52
2814/7		8,5	4,51	7,0	4,49	6,0	4,52
2159/3g	A.ustus	8,0	4,50	<u>4,0</u>	4,54	<u>1,5</u>	4,56
2159/4x	A.versicolor	9,5	4,51	8,5	4,53	7,5	4,53
190/75/1		8,5	4,51	8,0	4,52	7,0	4,50
525/12/74	P.chrysogenum	8,0	4,50	7,5	4,50	6,0	4,51
1988p	P.cyclopium	9,5	4,51	8,5	4,51	7,5	4,52
2112		9,5	4,51	8,5	4,50	7,5	4,50
1988	P.expansum	8,5	4,52	6,5	4,51	6,5	4,54
950/57/73	P.frequentans	8,0	4,50	7,0	4,52	5,5	4,49
950/69/73		8,5	4,51	8,0	4,51	6,5	4,44
2236/3/74	P.islandicum	8,0	4,50	7,0	4,30	5,5	4,15
2159/4		8,5	4,50	6,5	4,20	6,0	4,19
2036/1b/74	P.martensii	8,5	4,51	8,0	4,53	6,0	4,40
934/23/1973	P.notatum	8,0	4,50	7,5	4,52	6,0	4,49
2461/73		8,0	4,50	7,5	4,54	7,0	4,51
2036/1a/74	P.Palitans	8,5	4,50	7,0	4,50	5,5	4,50
708/6/74	P.roqueforti	9,5	4,52	9,0	4,51	7,0	4,50
311/74		9,5	4,51	8,5	4,49	7,5	4,50
2159/3b	P.variabile	8,0	4,50	6,5	4,50	6,0	4,49
525/7/74a	P.viridicatum	8,0	4,50	7,0	4,51	7,0	4,53
Kontrollen, unbeimpft		8,0- 9,5	4,50- 4,51	7,0- 8,5	4,48- 4,51	5,5- 7,5	4,49- 4,52

* Ausgangswerte

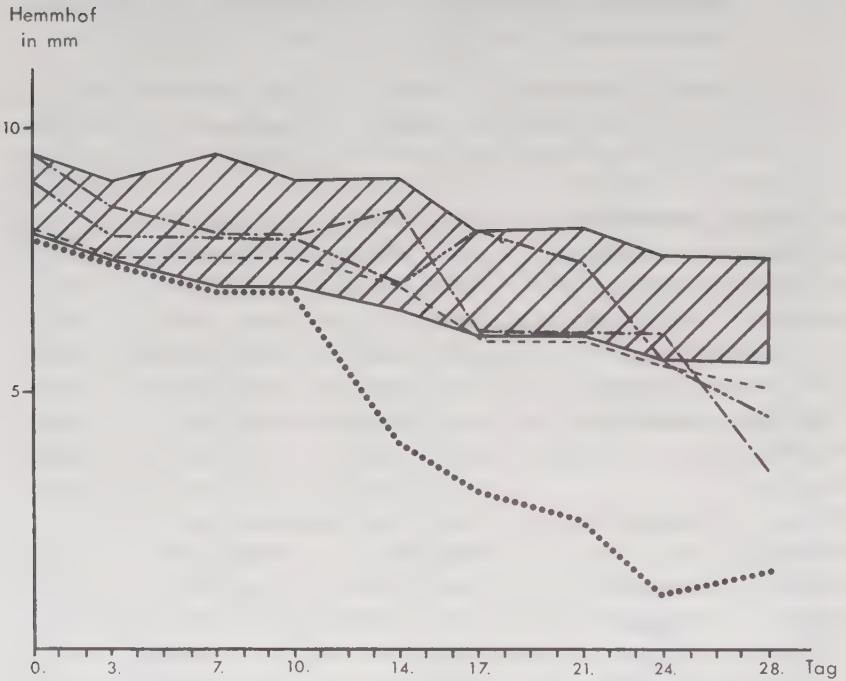


Abb. 18: Hemmhofradien zu den verschiedenen Zeiten der Prüfung auf Abbau von Bacitracin (Medium gepuffert, pH 4,50).



Schwankungsbreite der Werte der beimpften antibiotikahaltigen C-Base, die im Bereich derer der unbeimpften Kontrollen lagen.

Bestimmte Stämme konnten die antibiotische Aktivität geringgradig beeinflussen:

- · — · — · — A.nidulans 934/11/73
- — — — — A.nidulans 3301/2A/74
- · — · — · — A.nidulans 2159/4g
- · · · · A.ustus 2159/3g

Tab. 27: Ergebnisse der Überprüfung von Hemmhofgröße und pH-Wert während der Untersuchung des Abbaues von Bacitracin im ungepufferten Medium durch Schimmelpilze.

Stamm- bezeichnung	Art- zugehörigkeit	Zeitpunkt der Untersuchung					
		1. Tag*		14. Tag		28. Tag	
		Hemmhofra- dius in mm	pH	Hemmhofra- dius in mm	pH	Hemmhofra- dius in mm	pH
2814/10	A.amstelodami	8,0	5,95	6,0	5,28	5,0	4,40
86/75/4	A.candidus	8,0	5,84	6,5	6,10	6,0	6,00
88/75/2		8,0	5,84	6,0	6,13	6,0	6,02
3185/2/73	A.fumigatus	8,5	5,83	7,5	5,76	7,0	5,68
1710/1b/74		8,5	5,83	7,5	5,83	6,5	5,81
622b	A.flavus	8,0	5,95	6,5	4,52	4,5	4,57
2159/4g	A.nidulans	8,0	5,95	7,0	5,90	<u>0,0</u>	5,85
934/11/73		8,0	5,85	<u>0,0</u>	5,76	<u>0,0</u>	5,74
3301/2A/74		8,0	5,84	<u>0,0</u>	5,88	<u>0,0</u>	5,67
2814/5	A.terreus	8,5	5,83	7,0	5,82	5,0	5,74
2814/7		8,0	5,95	6,5	5,71	5,0	5,71
2159/3g	A.ustus	8,5	5,83	<u>0,0</u>	5,75	<u>0,0</u>	5,62
2159/4x	A.versicolor	8,0	5,85	6,0	5,57	5,0	5,65
190/75/1		8,0	5,84	6,0	6,08	5,5	5,80
525/12/74	P.chrysogenum	8,0	5,95	7,0	5,88	5,0	5,85
1988p	P.cyclopium	8,0	5,85	6,0	4,40	4,5	4,31
2112		8,0	5,85	6,0	4,00	6,0	3,78
1988	P.expansum	8,0	5,95	6,0	4,18	6,0	4,25
950/57/73	P.frequentans	8,0	5,92	7,0	3,95	5,5	3,79
950/69/73		8,0	5,84	6,0	4,45	6,0	3,80
2236/3/74	P.islandicum	8,0	5,93	6,5	3,00	5,0	2,81
2159/4		8,0	5,94	6,0	3,03	5,5	3,10
2036/1b/74	P.martensii	8,0	5,84	6,0	3,58	6,0	3,48
934/23/1973	P.notatum	8,0	5,94	7,0	5,55	5,0	5,44
2461/73		8,5	5,83	7,5	4,48	7,0	4,11
2036/1a/74	P.palitans	8,0	5,95	6,5	3,52	5,0	3,80
708/6/74	P.roqueforti	8,0	5,85	7,0	5,70	5,0	5,68
311/74		8,0	5,85	6,0	5,40	5,0	4,82
2159/3b	P.variabile	8,0	5,95	6,5	3,21	5,0	3,08
525/7/74a	P.viridicatum	8,5	5,83	7,5	4,15	7,0	3,56
Kontrollen, unbeimpft		8,0-	5,83-	5,5-	5,75-	4,0-	5,80-
		8,5	5,96	7,5	5,97	7,0	6,00

* Ausgangswerte

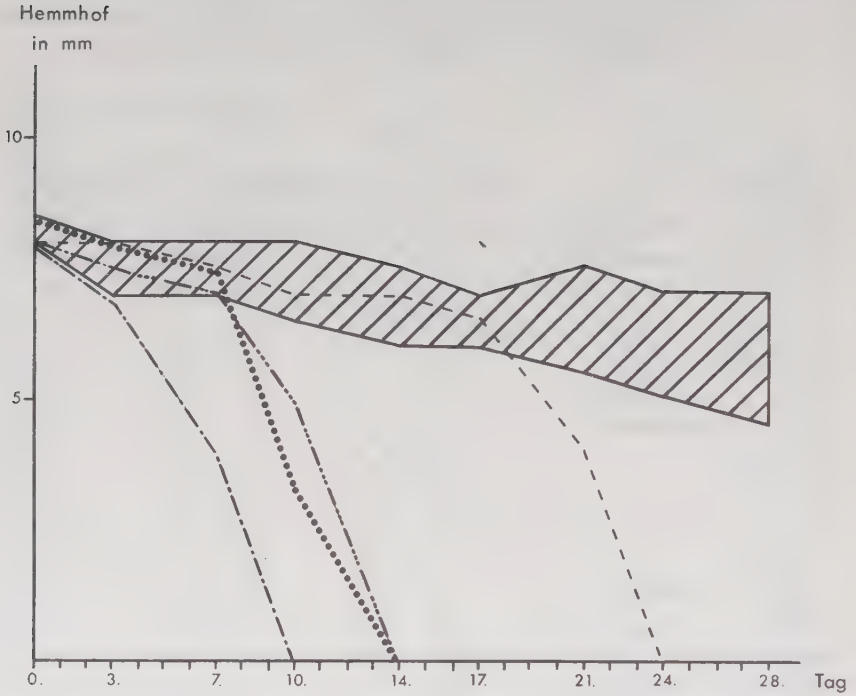


Abb. 19: Hemmhofradien zu verschiedenen Zeiten der Prüfung auf Abbau von Bacitracin (Medium ungepuffert).



Schwankungsbreite der Werte der beimpften antibiotikahaltigen C-Base, die im Bereich derer der unbeimpften Kontrollen lagen.

Bestimmte Stämme konnten die antibiotische Aktivität meßbar reduzieren:

- · — · — · — A.nidulans 934/11/73
- A.nidulans 3301/2A/74
- A.nidulans 2159/4g
- A.ustus 2159/3g

4. DISKUSSION

Die Untersuchungen haben gezeigt, daß Schimmelpilze der Gattungen *Aspergillus* und *Penicillium*, die aus Futtermitteln isoliert worden sind, Stoffe mit antibiotischen Aktivitäten zu bilden vermögen.

Schon in den Jahren zwischen 1940 und 1950 wurde eine große Anzahl von *Aspergillus*- und *Penicillium*-Stämmen auf die Bildung von antibiotischen Substanzen untersucht, wobei allerdings die Herkunft der Stämme keine besondere Berücksichtigung fand (WILKINS und HARRIS, 1942; WILKINS und HARRIS, 1944; COOK und LACEY, 1945; BRIAN und HEMMING, 1947; GILL-CAREY, 1949a; GILL-CAREY, 1949b, BURTON, 1949).

Die Ergebnisse aus dieser Zeit und die jetzt erfolgten Untersuchungen weisen darauf hin, daß die Eigenschaft, antibiotisch aktive Stoffe zu bilden, einerseits an die Schimmelpilzart, zum anderen aber auch an den einzelnen Stamm gebunden ist.

Bei Stämmen der Arten *P.frequentans* WESTLING, *P.roqueforti* THOM, *A.amstelodami* THOM & CHURCH, *A.repens* DE BARY, *A.austus* THOM & CHURCH konnte damals keine Synthese von antibiotisch aktiven Substanzen festgestellt werden (WILKINS und HARRIS, 1942; WILKINS und HARRIS, 1944); Stämme dieser Arten zeigten auch bei den eigenen Untersuchungen keine oder nur geringe antibiotische Aktivitäten. Über die unterschiedlich starke Entwicklung antibiotischer Stoffe durch verschiedene Stämme einer Art, wie sie bei den Stämmen von *P.cyclopium* WESTLING nachzuweisen war, wurde bereits von BRIAN und HEMMING (1947) berichtet. Die mehr oder weniger starke Bildung solcher Substanzen durch Stämme der Arten *P.canescens* SOPP, *P.chrysogenum* THOM, *A.fumigatus* FRESENIUS, *A.nidulans* EIDAM, *A.ochraceus* WILHELM oder *A.terreus* THOM konnten auch zu jener Zeit festgestellt werden (WILKINS und HARRIS, 1942; WILKINS und HARRIS, 1944). Die Möglichkeit der Bildung von Substanzen mit antibiotischen Eigenschaften in einem Futtermittel dürfte danach in erster Linie von den darin vorkommenden Schimmelpilzarten abhängig sein. Untersuchungen von GROSSBARD (1952) weisen darauf hin, daß diese Pilze solche Substanzen nicht nur in künstlichen Nährmedien, sondern auch auf pflanzlichem Substrat entwickeln,

wie es z.B. Weizenstroh oder Luzerne darstellt.

Die gemessenen antibiotischen Aktivitäten (maximal 13,0 IE Penicillin-Äquivalent/ml) erscheinen gering, jedoch könnten sie ausreichen, um das Futtermittel in seinen physiologischen Eigenschaften zu verändern. So glauben BREWER und TAYLOR (1972) Anhaltspunkte gefunden zu haben, daß die Pansengärung von Schafen und damit ihr Wachstum durch auf Futterpflanzen vorkommende Pilze und deren Stoffwechselprodukte negativ beeinflußt wird. Dabei stellt sich aber die Frage, ob die negative Wirkung durch antibiotische Aktivitäten oder durch die möglicherweise gebildeten Mykotoxine hervorgerufen ist.

Bei der Untersuchung, die dem Nachweis eventuell gebildeter Mykotoxine galt, fiel auf, daß bei keinem der 153 Stämme Aflatoxinsynthese festgestellt werden konnte. Dies mag einerseits mit der verhältnismäßig geringen Anzahl von untersuchten *Aspergillus*-Stämmen, vor allem der Art *A.flavus*, zusammenhängen, bestätigt aber andererseits die Vermutung von FRANK (1972a), daß Aflatoxine nicht von Vertretern der Gattung *Penicillium* gebildet werden, was auch aus Untersuchungen von MISLIVEC et al. (1968) und REHM (1972) hervorgeht.

Ebenso scheint das Vorkommen von Ochratoxin A und bzw. oder Citrinin bildenden Stämme in Futtermitteln selten zu sein. Nur ein Stamm der Art *P.cyclopium* WESTLING war dazu in der Lage. Bisher wurde berichtet, daß nur Stämme von *P.viridicatum* diese beiden Toxine gleichzeitig entwickeln können, während bei *P.cyclopium*-Stämmen jeweils nur ein Toxin nachweisbar war (SCOTT, 1972; LEISTNER, 1974; HARWIG, 1974).

Durch diese Untersuchung konnte erstmalig festgestellt werden, daß ein Stamm von *P.cyclopium* WESTLING, dessen Identität in zwei voneinander unabhängigen Untersuchungen im Centraalbureau voor Schimmelcultures Baarn bestimmt wurde, zur Synthese beider Toxine fähig ist.

Mit dem Vorkommen Sterigmatocystin bildender Stämme, wie *A.nidulans* EIDAM und *A.versicolor* TIRABOSCHI, in Futtermitteln muß gerechnet werden (s.S. 16). Bei eigenen, ergänzend durchgeführten, in dieser Arbeit nicht näher beschriebenen Untersuchungen, wurde festgestellt, daß im YES-Medium als positiv identifizierte Stämme auch in autoklaviertem Maismehl dieses

hepatotoxische und carcinogene Toxin bildeten. SCOTT (1972) konnte es in einer Getreideprobe nachweisen.

Verhältnismäßig oft wurde aus dem Untersuchungsmaterial *P.islandicum* SOPP isoliert, ein Schimmelpilz, der bislang vor allem mit dem sogenannten "gelben Reis" in Verbindung gebracht wurde. Überrascht hat vor allem, daß jeder der untersuchten Stämme dieser Art das carcinogene Toxin Luteoskyrin bildete. *P.islandicum* SOPP ist sicherlich nicht eine dominierende Schimmelpilzart in Futtermitteln, jedoch zeigen diese Untersuchungen und die Ergebnisse von REHM und SCHMIDT (1971), die die Luteoskyrinbildung in pflanzlichen Nahrungsmitteln untersuchten, daß mit diesem Toxin zu rechnen ist, wo immer sich dieser Pilz entwickelt.

Als eine der häufigsten Schimmelpilzarten in Futtermitteln darf *P.cyclopium* angesehen werden (SCOTT, 1972), der aus dem Untersuchungsmaterial insgesamt 63mal zu isolieren war. Der Sachverhalt, daß annähernd jeder dritte Stamm dieser Art zur Penicillinsäuresynthese in der Lage war, würde zunächst eine hohe Kontamination von Futtermitteln mit diesem Toxin vermuten lassen.

SCOTT (1972) berichtet jedoch, daß dieses Toxin in Untersuchungsmaterial nicht entdeckt werden konnte, selbst dann nicht, wenn Penicillinsäure bildende Stämme daraus isoliert worden waren. Obwohl dieses Toxin sowohl in Getreide nach gezielten Infektionsversuchen mit Penicillinsäure bildenden Stämmen nachzuweisen war (CIEGLER und KURTZMAN, 1970; KURTZMAN und CIEGLER, 1970; LILLEHOJ et al., 1972) als auch gelegentlich in natürlichem Untersuchungsmaterial (HESSELTINE, 1974) gefunden werden konnte, scheint dieses Toxin dennoch "in vivo" selten zu sein, da es verhältnismäßig instabil ist, wie Untersuchungen von SCOTT und SOMERS (1968) ergaben.

Die Untersuchungen zum Abbau von Antibiotika durch Schimmelpilze zeigten, daß zwei Prozesse zur Zerstörung von antibiotischen Substanzen wesentlich beitragen können.

Zum einen kann durch Stoffwechselprodukte der pH-Wert eines Substrates so verändert werden, daß dadurch die Stabilität vornehmlich pH-labiler Antibiotika beeinträchtigt wird. Zum anderen kann ein echter Abbau eines Antibiotikums durch Mikroorganismen

vorliegen. In Futtermitteln könnten Vorgänge wie Verbindung mit Spurenelementen (Chelatbildung) oder Adsorption an organische Bestandteile bzw. der Ablauf chemischer Reaktionen eine Rolle spielen. JEFFERYS (1952) und PRAMER (1958) messen diesen Möglichkeiten des Antibiotikaabbaues im Boden eine nicht unerhebliche Bedeutung bei.

Die Untersuchungen zeigten, daß Tetracyclin-Base nicht von den Schimmelpilzstämmen abgebaut wurde. Dieses Antibiotikum ist instabil vor allem bei pH-Werten, die im neutralen bzw. alkalischen Bereich liegen.

Die Stoffwechselprodukte von Schimmelpilzen haben vielfach sauren Charakter; es dürfte deshalb auch kaum zu einer indirekten Wirkung durch Schimmelpilze auf dieses Antibiotikum kommen. Dagegen wurde die antibiotische Aktivität von Penicillin G-Natrium durch Bildung saurer Stoffwechselprodukte von den Pilzen vornehmlich der Gattung *Penicillium* zerstört. Wie die Untersuchungen im gepufferten Medium zeigten, spielten keine anderen Stoffwechselvorgänge eine Rolle.

Ein echter Abbau unter Verlust der antibiotischen Aktivität konnte bei den Versuchen mit Bacitracin festgestellt werden. Dabei zeigte sich, daß nur Stämme der Arten *A.nidulans* EIDAM und ein Stamm von *A.ustus* THOM & CHURCH über derartige Eigenschaften verfügen. Da diese Schimmelpilzarten zwar nicht häufig, aber dennoch in Futtermitteln vorkommen und Bacitracin als Zinkbacitracin als Fütterungsantibiotikum Verwendung findet, kann es durchaus möglich sein, daß sich Prozesse dieser Art auch in Futtermitteln abspielen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

153 vornehmlich aus Futtermitteln isolierte Schimmelpilzstämmen der Gattungen *Penicillium* (16 Arten) und *Aspergillus* (12 Arten) wurden in YES-Medium angereichert und auf die Bildung von antibiotisch aktiven Stoffwechselprodukten mit Hilfe des Reihenverdünnungsverfahrens sowie der Agardiffusionsmethode unter Verwendung von *Bacillus stearothermophilus* als Testkeim untersucht.

Aus den Pilzkulturen wurden zuvor Chloroformextrakte hergestellt und diese zugleich auch dünnschichtchromatographisch auf das Vorhandensein bekannter Mykotoxine mit antibiotischen Eigenschaften geprüft.

30 dieser Stämme von insgesamt 19 verschiedenen Arten wurden außerdem hinsichtlich der Fähigkeit, bekannte Antibiotika zu inaktivieren bzw. als Stickstoffquelle zu nutzen, getestet. Hierzu wurde ihnen Tetracyclin-Base, Bacitracin oder Penicillin G-Natrium in Carbon Base, Difco, zum Wachstum angeboten und im Vergleich zu Kontrollen in regelmäßigen Abständen die Nährmedien in bezug auf ihre antibiotische Aktivität mit der Agarlochdiffusionsmethode untersucht. Dabei wurde auch der pH-Wert der Kulturflüssigkeit bestimmt.

Antibiotische Aktivitäten konnten in 71,90% der Kulturflüssigkeiten nachgewiesen werden, wobei die höchste antibiotische Wirkung 13,0 IE Penicillin-Äquivalent/ml entsprach.

57,49% der Chloroformextrakte ergaben im Agardiffusionstest Hemmhöfe, die größer oder gleich zwei Millimeter waren. Der größte meßbare Wert lag bei elf Millimeter. Eine Bildung von Mykotoxinen wurde bei 22,22% der untersuchten Stämme nachgewiesen. Die Chloroformextrakte von 34 Stämmen enthielten 19mal Penicillinsäure, 11mal Luteoskyrin, 3mal Sterigmatocystin und einmal Ochratoxin A und Citrinin.

Erstmals konnte die gleichzeitige Bildung von Ochratoxin A und Citrinin auch bei einem Stamm von *P.cyclopium* WESTLING festgestellt werden. Keiner der untersuchten Schimmelpilzstämmen erwies sich als Aflatoxinbildner.

Bei den Untersuchungen auf Abbau von Antibiotika zeigte sich, daß keiner der getesteten Schimmelpilzstämmen die antibiotische Aktivität von Tetracyclin-Base herabsetzen konnte. Penicillin G-Natrium wurde von 12 Stämmen inaktiviert, was auf eine Ansäuerung des Kulturmediums durch ihre Stoffwechselprodukte zurückzuführen war. Die antibiotische Wirkung des Bacitracins wurde durch Aspergillen völlig aufgehoben, soweit sie den Arten *A.nidulans* (3) und *A.ustus* (1) angehörten. Durch diese Versuche konnte nachgewiesen werden, daß in Futtermitteln vorkommende Schimmelpilzstämmen zu einem relativ hohen Prozentsatz Stoffe mit antibiotischer Wirkung synthetisieren, die zum Teil gesundheitsgefährdende Mykotoxine darstellen. Da manche Stämme Antibiotika allerdings durch direkte oder indirekte Stoffwechselleistungen zerstören können, muß damit gerechnet werden, daß während der Lagerung von Futtermitteln beide Vorgänge stattfinden.

5. SUMMARY

153 mould fungus strains of the genus *Penicillium* (16 species) and *Aspergillus* (12 species) were cultivated in YES-medium. The production of antibiotic metabolites was investigated by seriesdilution- and agardiscdiffusion-test. *Bacillus stearothermophilus* was used as test-microorganism.

Chloroform extracts were produced out of the whole cultures and also investigated by thin-layer chromatography for known mycotoxins with antibiotic capacities. 30 of the 153 strains which belonged to 19 various species were tested whether they were capable of inactivating known antibiotics, respectively using them as nitrogen-source. Tetracyclin-base, Bacitracin or Penicillin G-Natrium were added to Carbon Base, Difco, and the antibiotic activities were tested in regular periods by agarwholediffusion-test. The pH of the culture medium was always controlled.

Antibiotic activities could be detected in 71,90% of the culture mediums, the highest antibiotic effect being equivalent to 13,0 IE Penicillin-Equivalent/ml.

57,49% of the chloroform extracts showed in the agardisc-diffusion-test zones of inhibition which were equal or larger than two millimetres. The largest zone of inhibition which was measured had a radius of eleven millimetres.

The production of mycotoxins could be discovered in 22,22% of the strains. The chloroform extracts contained nineteen times Penicillic acid, eleven times Luteoskyrin, three times Sterigmatocystin and once Ochratoxin A and Citrinin. For the first time the simultaneous production of Ochratoxin A and Citrinin could be detected in a strain of *P.cyclopium* WEST-LING. None of the examined mould strains produced Aflatoxins. After the investigation regarding the degradation of antibiotics, it showed that none of the mould strains could lower the activity of Tetracyclin-base. Penicillin G-Natrium had been inactivated by 12 strains. This was due to a lowering of pH of the culture mediums by the metabolites of these 12 strains. The antibiotic activity of Bacitracin could be

completely neutralized by Aspergilli, if they belonged to the species *A.nidulans* (3) and *A.ustus* (1).

These investigations proved that mould fungi, found in feeds synthesize in a relative high percentage substances with antibiotic effects. These are sometimes noxious mycotoxins. Some strains are however capable of destroying antibiotics by direct or indirect metabolic effects. Therefore it may be expected that both processes take place during the storage of feeds.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- | | | |
|---|-------|---|
| ABD-EL-Malek, J.,
M. MONIB, A. HAZEM | 1961: | Chloramphenicol, a simultaneous carbon and nitrogen source for a <i>Streptomyces</i> sp. from Egyptian soil.
Nature, <u>189</u> , 775-776. |
| ABRAHAM, E.P.,
E. CHAIN | 1940: | An enzyme from bacteria able to destroy penicillin.
Nature, <u>146</u> , 837. |
| ARAI, T., T. ITO,
Y. KOYAMA | 1967: | Antimicrobial activity of aflatoxins.
J. Bact., <u>93</u> , 59-64. |
| BILAI, V.I. | 1963: | Antibiotic-producing microscopic fungi. Elsevier Publishing Co., Amsterdam. |
| BREWER, D.,
A. TAYLOR | 1972: | Ovine ill-thrift in Nova Scotia. II. The production of antibiotics by fungi isolated from forest and marshland soil. J. agric. Sci., Camb., <u>78</u> , 257-264. |
| BRIAN, P.W.,
H.G. HEMMING | 1947: | Production of antifungal and antibacterial substances by fungi; preliminary examination of 166 strains of <i>Fungi Imperfecti</i> . J. gen. Microbiol., <u>1</u> , 158-167. |
| BRUNNER, R.,
G. MACHEK | 1970: | Antibiotika, Bd. III.: Die kleinen Antibiotika.
Verlag Hans Carl, Nürnberg. |
| BU LOCK, J.D. | 1970: | Biosynthese von Naturstoffen.
B.L.V., München. |
| BURTON, H.S. | 1949: | Antibiotics from <i>Penicillia</i> . Brit. J. exp. Path., <u>30</u> , 151-158. |
| BUTLER, W.H. | 1974: | Aflatoxin. In PURCHASE, I.F.H., Mycotoxins. Elsevier Scientific Publishing Co., Amsterdam, Oxford, New York, 1-28. |

- CHRISTENSEN, C.M. 1951: Fungi on and in wheat seed. Cereal Chem., 28, 408-415.
- CHRISTENSEN, C.M. 1957: Deterioration of stored grains by fungi. Bot. Rev., 23, 108-134.
- CHRISTENSEN, C.M. 1962: Lagerschäden durch Pilzbefall bei Getreide. Getreide und Mehl, 12, 78-81.
- CIEGLER, A., R.W. DETROY, E.B. LILLEHOJ 1971: Patulin, penicillic acid, and other carcinogenic lactones. In CIEGLER, A., S. KADIS, S.J. AJL, Microbial toxins, Vol. VI: Fungal toxins. Academic Press, New York, London, 409-434.
- CIEGLER, A., C.P. KURTZMAN 1970: Penicillic acid by blue-eye fungi on various agricultural commodities. Appl. Microbiol., 20, 761-764.
- COLE, M. 1966: Formation of 6-aminopenicillanic acid, penicillins, and penicillin acylase by various fungi. Appl. Microbiol., 14, 98-104.
- COOK, A.H., M.S. LACEY 1945: Production of antibiotics by fungi. Brit. J. exp. Path., 26, 404-408.
- DAVIS, D.N., U.L. DIENER, D.W. ELDRIDGE 1966: Production of aflatoxins B₁ and G₁ by *Aspergillus flavus* in a semi-synthetic medium. Appl. Microbiol., 14, 378-380.
- DELCAMBE, L. 1964: Some practical resolutions adopted after the meeting in Stuttgart. Information Bull. 1 of the International Center of Informations on Antibiotics, 23-30.
- DELCAMBE, L. 1967: The producing strains of antibiotics (part I.). Information Bull. 4, of the International Center of Informations on Antibiotics, 4-136.
- DELCAMBE, L. 1968: The producing strains of antibiotics (part. II). Information Bull. 5 of the International Center of Informations on Antibiotics, 8-131.

- DELCAMBE, L. 1969: The producing strains of anti-biotics (part III.). Information Bull. 6 of the International Center of Informations on Antibiotics, 2-148.
- DELCAMBE, L. 1969 a: The producing strains of anti-biotics (part IV.). Information Bull. 7 of the International Center of Informations on Antibiotics, 1-147.
- DETROY, R.W., E.B. LILLEHOJ, A. CIEGLER 1971 : Aflatoxin and related compounds. In CIEGLER, A., KADIS, S., AJL, S.J., Micobial toxins, Vol. VI: Fungal toxinsw Academic Press, New York, London, 4-178.
- ENOMOTO, M., I. UENO 1974: Penicillium islandicum (toxic yellowed rice), - luteoskyrin - islanditoxin - cyclochlorotine. In PURCHASE, I.F.H., Mycotoxins. Elsevier Scientific Publishing Co, Amsterdam, Oxford, New York, 303-326.
- FLANNIGAN, B. 1970: Comparison of seed-borne mycofloras of barley, oats and wheat. Trans. Br. mycol. Soc., 55, 267-276.
- FLANNIGAN, B. 1974: Distribution of seed-borne micro-organisms in naked barley and wheat before harvest. Trans. Br. mycol. Soc., 62, 51-58.
- FRANK, H.K. 1972: Mikrobiologische Verunreinigungen in Enzympräparaten für die Lebensmitteltechnologie. Deutsche Lebensmittel-Rundschau, 68., Jahrg., 252-256.
- FRANK, H.K. 1972 a: Zweifel über das Vorkommen von Aflatoxin bei der Gattung Penicillium. Z. Lebensmittel-Unters.-Forsch., 150, 151-153.
- FRANK, H.K. 1974: Toxische Stoffwechselprodukte von Schimmelpilzen. Alimenta, 13, 98-101.

- | | | |
|------------------|---------|---|
| GEDEK, B. | 1968: | Hefen als Krankheitserreger bei Tieren.
VEB Gustav Fischer Verlag, Jena. |
| GEDEK, B. | 1973: | Futtermittelverderb durch Bakterien und Pilze und seine nachteiligen Folgen.
Übers. Tierernährg., <u>1</u> , 45-56. |
| GEDEK, B. | 1974: | Möglichkeiten und Grenzen der mikrobiologischen Futtermittelkontrolle.
Dtsch. Tierärztl. Wschr., <u>81</u> , Heft Nr. 2, 37-40 und Heft Nr. <u>3</u> , 65-68. |
| GILL-CAREY, D. | 1949: | Antibiotics from Aspergilli.
Brit. J. exp. Path., <u>30</u> , 114-118. |
| GILL-CAREY, D. | 1949 a: | The nature of some antibiotics from Aspergilli.
Brit. J. exp. Path., <u>30</u> , 119-123. |
| GOLDBLATT, L.A. | 1969: | Aflatoxin. Academic Press, New York, London. |
| GRAM, H.G. | 1956: | Antibiotika als Stickstoffquelle für <i>Candida albicans</i> .
Zbl. Bakt. I. Orig., <u>166</u> , 199-205. |
| GROSSBARD, E. | 1952: | Antibiotic production by fungi on organic manures and in soil.
J. gen. Microbiol., <u>6</u> , 295-310. |
| HARWIG, J. | 1974: | Ochratoxin A and related metabolites. In PURCHASE, I.F.H., Mycotoxins. Elsevier Scientific Publishing Co., Amsterdam, Oxford, New York, 345-368. |
| HESSELTINE, C.W. | 1974: | Natural occurrence of mycotoxins in cereals. Mycopathol. et Mycol. Applicata, <u>53</u> , 141-153. |
| HOLZAPFEL, C.W. | 1971: | Cyclopiazonic acid and related toxins. In CIEGLER, A., KADIS, S., AJL, S.J., Microbial toxins, Vol. VI: Fungal toxins. Academic Press, New York, London, 435-459. |
| HYDE, M.B. | 1950 | The subepidermal fungi of cereal grains. I. A survey of the world distribution of fungal mycelium in wheat. Ann. appl. Biol., <u>37</u> , 179-186. |

- | | | |
|--|-------|---|
| HYDE, M.B.,
H.B. GALLEYMORE | 1951: | The subepidermal fungi of cereal grains. II. The nature, identity and origin of the mycelium in wheat. Ann. appl. Biol., <u>38</u> , 348-356. |
| IYER, S.N., A.T. DUDANI,
D.L. SHRIVASTAVA | 1954: | Aureomycin inactivation by pathogenic bacteria. Experientia, <u>10</u> , 249-250. |
| JARVIS, B. | 1971: | Factors affecting the production of mycotoxins. J. appl. Bact., <u>34</u> , 199-213. |
| JEFFERYS, E.G. | 1952: | The stability of antibiotics in soils. J. gen. Microbiol., <u>7</u> , 295-312. |
| KENT, J.,
N.G. HEATLEY | 1945: | Antibiotics from moulds. Nature, <u>156</u> , 295-296. |
| KIRCHGESSNER, M. | 1970: | Tierernährung, DLG-Verlag, Frankfurt am Main. |
| KLEIN, D.,
D. PRAMER | 1961: | Bacterial dissimilation of streptomycin. J. Bact., <u>82</u> , 505-510. |
| KOEHLER, B. | 1938: | Fungus growth in shelled corn as affected by moisture. J. Agr. Res., <u>56</u> , 291-307. |
| KORZYBSKI, T.,
W. KURYLWICZ | 1961: | Antibiotica. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena. |
| KREHL-NIEFFER, R.M. | 1951: | Verbreitung und Physiologie mikroskopischer Bodenpilze. Arch. Mikrob., <u>15</u> , 389-402. |
| KROGH, P. | 1974: | Mycotoxic nephropathy. In PURCHASE, I.F.H., Mycotoxins. Elsevier Scientific Publishing Co., Amsterdam, Oxford, New York, 418-428. |
| KROGH, P., E. HASSELAGER,
P. FRIIS | 1970: | Studies on fungal nephrotoxicity. Acta path. microbiol. scand. Section B, <u>78</u> , 401-413. |

- MANN, R., H.J. REHM 1975: Degradation of aflatoxin B₁ by microorganisms. Naturwissenschaften, 62, 537.
- MEYERS, E., D.A. SMITH 1962: Microbiological degradation of tetracyclines. J. Bact., 84, 797-802.
- MILITZER, S. 1968: Mykologische Untersuchungen an Maissilagen aus dem Raum Berlin. Vet. Med. Diss., Humboldt-Universität Berlin.
- MILNER, M., C.M. CHRISTENSEN, W.F. GEDDES 1947: Grain storage studies. V. Chemical and microbiological studies on "sick" wheat. Cereal Chem., 24, 23-38.
- MISLIVEC, P.B., J.H. HUNTER, J. TUIITE 1968: Assay for aflatoxin production by the genera *Aspergillus* and *Penicillium*. Appl. Microbiol., 16, 1053-1055.
- MISLIVEC, P.B., J. TUIITE 1970: Species of *Penicillium* occurring in freshly-harvested and in stored dent corn kernels. Mycologia, 62, 67-74.
- MORTON, H.E., W. KOCHOLATY, R. JUNOWICZ-KOCHOLATY, A. KELNER 1945: Toxicity and antibiotic activity of kojic acid produced by *Aspergillus luteo-virescens*. J. Bact., 50, 579-584.
- MOOS, M.O. 1971: The rubratoxins, toxic metabolites of *P. rubrum* STOLL. In CIEGLER, A., KADIS, S., AJL, S.J., Microbial toxins, Vol. VI: Fungal toxins. Academic Press, New York, London, 381-408.
- MÜLLER, E. 1974: Was sind Schimmelpilze und Hefen? Alimenta, 13, 50-53.
- MÜLLER, E., W. LOEFFLER 1968: Mycologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- MULINGE, S.K., C.G.C. CHESTERS 1970: Ecology of fungi associated with moist stored barley grain. Ann. appl. Biol., 65, 277-284.

- NEWBERNE, P.M. 1-74: *Penicillium rubrum* - rubratoxins. In PURCHASE, I.F.H., *Mycotoxins*. Elsevier Scientific Publishing Co., Amsterdam, Oxford, New York, 163-180.
- NIEBERLE, K.,
P. COHRS 1970: *Lehrbuch der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- NIETHAMMER, A. 1939: *Mikroskopische Bodenpilze als Begleiter in Früchten und Samen*. Arch. Mikrob., 10, 13-25.
- NIETHAMMER, A. 1947: *Technische Mykologie*. Enke Verlag, Stuttgart.
- NISSSEN, T.V. 1954: *Effects of antibiotics on carbon dioxide production in soil*. Nature, 174, 226-227.
- OKU, H., T. NAKANSHI 1964: *Reductive detoxification of an antibiotic, aschotine, by an insensitive fungus, Fusarium lycopersici SACC.* Naturwissenschaften, 51, 538.
- ORTH, R. 1972: *Bildungsbedingungen einiger carcinogener Mykotoxine*. Referat, Mykotoxin Symposium der Bundesforschungsanstalt für Lebensmittel-frischhaltung, Karlsruhe.
- PANASENKO, V.T. 1944: *The ecology of molds*. Mikrobiologia, 13, 158-170.
- PANASENKO, V.T. 1967: *Ecology of microfungi*. Bot. Rev., 33, 189-215.
- PRAMER, D. 1958: *Microbiological process report. The persistence and biological effects of antibiotics in soil*. Appl. Microbiol., 6, 221-224.
- PURCHASE, I.F.H. 1974: *P. cyclopium*. In PURCHASE, I.F.H., *Mycotoxins*. Elsevier Scientific Publishing Co., Amsterdam, Oxford, New York, 149-162.

- | | | |
|--------------------------------------|---------|--|
| REHM, H.J. | 1972: | Mykotoxine in Lebensmitteln. VI. Mitteilung. Aflatoxinbildung verschiedener Pilzarten. Z. Lebensmittel-Unters.-Forsch., <u>150</u> , 146-151. |
| REHM, H.J.,
I. SCHMIDT | ° 1971: | Mykotoxine in Lebensmittel. V. Mitteilung. Bildung von Luteoskyrin in verschiedenen Lebensmitteln. Zbl. Bakt. II. Org., <u>126</u> , 382-385. |
| REISS, J. | 1971: | Inhibition of fungal sporulation by Aflatoxin. Arch. Mikrob., <u>76</u> , 219-222. |
| REISS, J. | 1975: | Mycotoxin bioassay, using Bacillus stearothermophilus. J. Ass. Offic. Anal. Chem., <u>58</u> , 624-625. |
| RICHARDSON, L.R.,
B.D. WEBB | 1961: | Spoilage control in mixed feeds. Cereal Science Today, <u>6</u> , 260-267. |
| SAITO, M., M. ENOMOTO,
T. TATSUNO | 1971: | Luteoskyrin and related compounds, chlorine-containing compounds, and citrinin. In CIEGLER, A., KADIS, S., AJL, S.J., Microbial toxins, Vol. VI: Fungal toxins. Academic Press, New York, London, 299-367. |
| SCHMIDT, H.L. | 1965: | Über Keimbesatz und Keimverunreinigungen von Handelsfuttermitteln. Getreide und Mehl, <u>15</u> , 28-34. |
| SCHMIDT, H.L. | 1966: | Die Mikroflora der Maniokfuttermittel. Getreide und Mehl, <u>16</u> , 105-110. |
| SCHMIDT, H.L. | 1968: | Zur Mikrobiologie der Handelsfuttermittel. Landwirtschaftl. Forsch. <u>21</u> , 146-163. |
| SCHMIDT, H.L. | 1973: | Futtermittelmikrobiologie und Futtermittelqualität. Die Bodenkultur, <u>24</u> , 4-12. |

- SCHMIDT, H.L. 1974: Über das Mikroorganismenvorkommen und die Möglichkeiten zur Steuerung des Keimbesatzes bei Futtermitteln. In: Unerwünschte Stoffe in Futtermitteln und mögliche Rückstände in Lebensmitteln. Hrsg. Fachverband der Futtermittelindustrie e.V., Hamburg.
- SCHMIDT, H.L. 1975: Über Vorkommen und Häufigkeit von hohen Pilzkeimgehalten sowie einzelner Pilzarten in Futtermitteln. Landwirtschaftl. Forsch., 28, 224-234.
- SCOTT, P.M., J.W. LAWRENCE, W. VAN WALBEEK 1970: Detection of mycotoxins by thin-layer chromatography: Application to screening of fungal extracts. Appl. Microbiol., 20, 839-842.
- SCOTT, P.M., E. SOMERS 1968: Stability of patulin and penicillic acid in fruit juice and flour. J. Agr. Food Chem., 16, 483-485.
- SCOTT, P.M., W. VAN WALBEEK, B. KENNEDY, D. ANYETI 1972: Mycotoxins (ochratoxin A, citrinin, and sterigmatocystin) and toxinogenic fungi in grains and other agricultural products. J. Agr. Food Chem., 20, 1103-1109.
- SCURTI, J., C. CANTINI, B. COLOMB 1968: Ricerche sui miceti foraggi conservati e sulla loro tossicità. Allionia, 14, 113-121.
- SEBEK, O.K. 1971: Microbial transformation of antibiotics. In PERLMAN, D., Advan. Appl. Microbiol.. Academic Press, New York, London, 14, 123-150.
- SEBEK, O.K. 1974: Microbial conversion of antibiotics. Lloydia, 37, 115-133.
- SNELL, W.H., E.A. DICK 1957: A glossary of mycology. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.

- SNOW, D. 1945: Mould deterioration of feeding stuffs in relation to humidity of storage. Part III. The isolation of mould species from feeding stuffs stored at different humidities. Ann. appl. Biol., 32, 40-44.
- SORGER-DOMENIGG, H.,
L.S. CUENDET, 1955:
C.M. CHRISTENSEN,
W.F. GEDDES Grain storage studies. XVII. Effect of mold growth during temporary exposure of wheat to high moisture contents upon the development of germ damage and other incides of deterioration during subsequent storage. Cereal Chem., 32, 270-285.
- SPESIVCEVA, N.A.,
V.A. BALABANOV 1968: Toksiceskie griby svezenbrannojo kukuruzy (Toxische Pilze beim frisch eingebrachten Körnermais). Trudy VNIIVS, Vsesojuznyj nauchno-issledovatel'skij institut veterinarnoj sanitarii Moskva, 30, 73-83. (Referat, Landwirtschaftl. Zbl. 4-69/04-0677).
- SPICHER, G. 1956: Vergleichende Untersuchungen über die Mikroflora des Getreides. Zbl. Bakt. II. Orig., 109, 589-610.
- SPICHER, G. 1958: Einleitende Untersuchungen über die Zusammensetzung der Mikroflora des Getreides. Zbl. Bakt. II. Orig., 111, 237-248.
- SPICHER, G. 1973: Die Mikrobiologie des Getreides und der Getreideprodukte. Die Bodenkultur, 24, 13-31.
- SPICHER, G. 1974: Schimmelpilze in Getreide und Cerealien. Alimenta, 13, 108-121.
- STANKOUSHEV, N. 1967: Vurchu mikoflorata na zurnenite furazi. IV. Plesenni gubicki po kombinivanite furazo v razlici na proizvodsto i suchranenie (Die Mikroflora des Futtergetreides. IV. Mitteilung. Schimmelpilze im Mischfutter in verschiedenen Stufen der Herstellung und Lagerung). Veterinarnomedicinski nauki, Sofia, 4, 71-77.

- | | | |
|---|-------|---|
| STEYN, P.S. | 1971: | Ochratoxin and other dihydroisocoumarins. In CIEGLER, A., KADIS, S., AJL, S.J., Microbial toxins, Vol. VI: Fungal toxins. Academic Press, New York, London, 179-207. |
| THALMANN, A. | 1971: | Veränderungen in der Mikroflora von Futtermitteln bei der Lagerung. Landwirtschaftl. Forsch., <u>26</u> , II. Sonderheft, 58-62. |
| THOM, C.,
E. LE FEVRE | 1921: | Flora of corn meal.
J. Agr. Res., <u>22</u> , 179-188. |
| TURNER, W.B. | 1971: | Fungal metabolites. Academic Press, New York, London. |
| UENO, Y. | 1974: | Citreoviridin from <i>Penicillium citreo-viride</i> BOURGE. In PURCHASE I.F.H., Mycotoxins. Elsevier Scientific Publishing Co., Amsterdam, Oxford, New York, 283-302. |
| VAN WALBEEK, W., P.M. SCOTT,
F.S. THATCHER | 1968: | Mycotoxins from food-borne fungi. Can. J. Microbiol., 131-137. |
| VEZINA, C., S.N. SEHGAL,
K. SINGH | 1968: | Transformation of organic compounds by fungal spores. In PERLMAN, D., Advan. Appl. Microbiol. Academic Press New York, London, <u>10</u> , 221-268. |
| VON ARX, J.A. | 1967 | Pilzkunde.
Cramer Verlag, Lehre. |
| WALLHÄUSER, K.H.,
H. SCHMIDT | 1967 | Sterilisation, Desinfektion, Konservierung, Chemotherapie.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart. |
| WALTER, A.M.,
L. HEILMEYER | 1969: | Antibiotika-Fibel.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart. |
| WEBER, E. | 1972: | Grundriß der biologischen Statistik.
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart. |

- WILKINS, W.H.,
G.C.M. HARRIS 1942: Investigation into the production
 of bacteriostatic substances by
 fungi. I. Preliminary examination
 of 100 fungal species.
 Brit. J. exp. Path., 23, 166-169.
- WILKINS, W.H.,
G.C.M. HARRIS ° 1944: Investigation into the production
 of bacteriostatic substances by
 fungi. Preliminary examination of
 a fourth 100 species, all Peni-
 cillia. Brit. J. exp. Path., 25,
 135-137.
- WILSON, B.J. 1971: Miscellaneous Aspergillus toxins.
 In CIEGLER, A., KADIS, S., AJL,
 S.J., Microbial toxins, Vol. VI:
 Fungal toxins. Academic Press, New
 York, London, 208-298.
- WILSON, B.J. 1971 a: Miscellaneous Penicillium toxins.
 In CIEGLER, A., KADIS, S., AJL,
 S.J., Microbial toxins, Vol. VI:
 Fungal toxins. Academic Press,
 New York, London, 460-521.
- YAZDANY, S.,
K.B. LASHKARI 1975: Effect of pH on sporulation of
 Bacillus stearothermophilus.
 Appl. Microbiol., 30, 1-3.
- ZÄHNER, H. 1965: Biologie der Antibiotika.
 Springer-Verlag, Berlin, Heidel-
 berg, New York.

Frau Prof. Dr. B. Gedek möchte ich für die Überlassung des Themas, die Betreuung der Arbeit und die mir jederzeit gewährte Aussprache recht herzlich danken.

Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. A. Mayr danke ich besonders für die mir bereitwillig gewährte Arbeitsmöglichkeit und sein stetes Interesse an meiner Arbeit.

Ebenso möchte ich Frä. Dr. D. I. Kahlau für die stets freundlich gewährte Hilfe danken.

LEBENS LAUF

=====

Am 1. August 1948 wurde ich, Johann Michael Bauer, als Sohn des Kraftfahrzeugmeisters Xaver Bauer und seiner Ehefrau Franziska, geb. Zillner, in Dingolfing geboren.

Im September 1954 trat ich in die Volksschule Dingolfing ein. 1958 wechselte ich auf das Gymnasium Dingolfing über, wo ich im Juli 1968 das Abitur ablegte.

Nachdem ich an der Technischen Universität München zwei Semester Physik studiert hatte, begann ich im Wintersemester 1969/70 mit dem Studium der Tiermedizin an der Tierärztlichen Fakultät der Universität München.

Am 29.9.1972 heiratete ich meine Frau Christa, geb. Langer.

Das Staatsexamen legte ich im Herbst 1974 ab und erhielt mit Wirkung vom 3.12.1974 die Bestallung als Tierarzt.

Die vorliegende Arbeit begann ich im Dezember 1974 am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin im Fachbereich Tiermedizin der Ludwig-Maximilians-Universität München.

